EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS ZELLULÄRER IMMUNREAKTIONEN GEGEN CHEMISCH INDUZIERTE GLIOME DER RATTE

Thomas Bilzer

1981

Aus dem Institut für Tierpathologie
der Universität München
angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. D. Stavrou

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS ZELLULÄRER IMMUNREAKTIONEN GEGEN CHEMISCH INDUZIERTE GLIOME DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Thomas Bilzer
aus Frankfurt am Main

München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. D. Stavrou

Korreferent: Prof. Dr. R. Hoffmann

Tag der Promotion: 27. Februar 1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

INHALTSÜBERSICHT

Seite

EINLEITUNG 1

LITERATURÜBERSICHT

1. Nitrosamidinduzierte Hirntumoren 3
2. Modifikation tumorassoziierter Antigene 4
3. Zelluläre Antikörper 5
4. Anreicherung von Lymphocyten 6

PROBLEMATIK 8

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methoden

1. Versuchstiere 9
2. Tumoren
   - 2.1. Tumorinduktion 9
   - 2.2. Primärtumoren und permanente Zellinien 10
   - 2.3. Transplantationstumoren
     - 2.3.1. Intracerebrale Transplantate 11
     - 2.3.2. Subkutane Transplantate 11
   - 2.4. Histologische Untersuchungen 11
   - 2.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen 12
   - 2.6. Tumorzellkulturen
     - 2.6.1. Primärkulturen und Kulturen aus Transplantationstumoren 12
     - 2.6.2. Zellinien 13
     - 2.6.3. Zellklone 13
     - 2.6.4. Konservierung 13
     - 2.6.5. Nachweis gliaspezifischer Proteine 14
   - 2.7. Tumorogenität 14

Seite

3. Hirnzellkulturen 15
4. Immunisierungen
4.1. Chemische Modifikation 15
4.2. Immunisierungsverfahren 16
4.3. Applikationsart 16
5."Challenge"
5.1. Tumorträger 18
5.2. Regressortiere 18
5.2. Immunisierte Tiere 18
6. Anreicherung von Lymphocyten
6.1. Lymphocyten aus dem peripheren Blut 19
6.2. Lymphocyten aus der Milz, den Lymphknoten und dem Thymus 19
6.3. Lymphocyten aus Gliomgewebe
6.3.1. Tumorzellsuspensionen 20
6.3.2. Tumorinfiltrierende Lymphocyten 20
6.4. Gemischte Lymphocytenkulturen 21
6.5. Trennung von B- und T-Lymphocyten 21
7.Reaktionen von Lymphocyten gegen Gliomzellen in vitro
7.1. Lymphocyten-Mikrocytotoxizitäts-Test (LMC) 22
7.2. Colony-Inhibition-Test (CI) 23
7.3. Ultrastruktureller Nachweis von Zellinteraktionen 24

B. Ergebnisse

1. Lichtmikroskopische Befunde
1.1. Primärtumoren 25
1.2. Transplantationstumoren und Tumormetastasen 25
1.3. Zellkulturen 26
2. Ultrastrukturelle Befunde
2.1. Tumoren 26
2.2. Zellkulturen 28

Seite

3. Gliaspezifische Proteine 28
4. Tumorogenität
   4.1. Mindestzellzahlen 29
   4.2. Tumorwachstum 30
   4.3. Spontane Rückbildung 31
5. Immunisierungen 31
6. "Challenge"
   6.1. Tumorträger 32
   6.2. Regressortiere 32
   6.3. Immunisierte Tiere 32
7. Reaktivität von Lymphocyten gegen Gliomzellen in vitro
   7.1. Lymphocyten-Mikrocytotoxizitäts-Test (LMC) 33
      7.1.1. Tumorträger 33
      7.1.2. Immunisierte Tiere 37
         7.1.2.1. Immunisierungen mit DMS-modifizierten Gliomzellen 37
         7.1.2.2. Immunisierungen mit TNBS-modifizierten Gliomzellen 39
         7.1.2.3. Immunisierung mit nativen Gliomzellen 42
         7.1.2.4. Immunisierung mit TNBS-modifizierten Hirnzellen 42
         7.1.2.5. Kontrollen 42
   7.2. Colony-Inhibition-Test (CI)
      7.2.1. Tumorträger 42
      7.2.2. Immunisierte Tiere 43
   7.3. Zellvermittelte Cytolyse - Ultrastrukturelle Befunde 43

DISKUSSION 48

ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY 55

LITERATURVERZEICHNIS 59

EINLEITUNG

Die immunologische Überwachung des Tumorwachstums beruht zum einen auf der Fähigkeit des Immunsystems, fremdes Gewebe zu erkennen, zum anderen setzt sie Antigene bei der Tumorzelle voraus, gegen die der Wirtsorganismus humorale und/oder zelluläre Immunreaktionen entwickeln kann. Eine wichtige Rolle bei der Auseinandersetzung zwischen Wirt und Tumor scheinen die bei einer Vielzahl von spontanen und experimentellen Tumoren vorkommenden tumorassoziierten Antigene zu spielen (BALDWIN u. PRICE, 1976). So entfalten auch die Tumoren des Nervensystems antigene Eigenschaften, die eine Antwort des Immunsystems hervorrufen können. Dies gilt sowohl für einige der Gliomtypen des Menschen (Lit. bei NEUWELT u. CLARK, 1978), als auch für nitrosamid-induzierte Hirntumoren als gesichert (LIM u. KLUSKENS, 1970; DAY u. BIGNER, 1973; STAVROU, 1976; CRAVIOTO, 1978). Morphologische Befunde - die Infiltration von Tumorgewebe mit Lymphocyten - ließen schon um die Jahrhundertwende vermuten, daß Lymphocyten Träger der immunologischen Abwehrreaktion gegen Tumoren sind. Nachdem mit der Entdeckung der Gesetze der Transplantationsimmunologie und der Züchtung syngener Tierstämme in den vierziger und fünfziger Jahren die notwendigen Voraussetzungen für die moderne experimentelle Tumorimmunologie geschaffen waren, zeigten die Übertragungsversuche MITCHISON's (1954), daß bei der Tumorabwehr die zellulären Immunreaktionen den Ausschlag geben. Trotzdem reichen systematische Untersuchungen der zellulären Immunantwort kaum mehr als zehn Jahre zurück. Der entscheidende Fortschritt auf diesem Gebiet kam erst mit der Entwicklung der

in-vitro-Testsysteme Ende der sechziger Jahre, vor allem durch HELLSTRÖM u. HELLSTRÖM (1969, 1971), TAKASUGI u. KLEIN (1970).

Die Beobachtung lymphocytärer Infiltrationen in menschlichem und experimentellem Gliomgewebe (BERTRAND u. MANNEN, 1960; RIDLEY u. CAVANAGH, 1971; BROOKS et al., 1977; DI LORENZO et al., 1977; STAVROU et al., 1977; WOOD, 1979) und der Nachweis gezielter lymphocytärer Immunreaktionen gegen gliomassoziierte Antigene in vitro (KUMAR u. TAYLOR, 1973; CORNAIN et al., 1975; WOOSLEY et al., 1977; LEVY, 1978) lassen eine entscheidende Bedeutung der Lymphocyten bei der Gliom/Wirt-Auseinandersetzung vermuten.

Die Untersuchung von Entwicklung und Ablauf lymphocytärer Immunreaktionen gegen gliomassoziierte Antigene soll dazu beitragen, die Voraussetzungen für den Einsatz immunologischer Methoden in der Diagnose und möglicherweise in der Therapie neurogener Tumoren zu verbessern.

LITERATURÜBERSICHT

1. Nitrosamidinduzierte Hirntumoren

N - Methyl - N - nitrosoharnstoff (MNH) gehört zu einer Gruppe von Resorptivkanzerogenen mit ausgesprochen selektiver Organotropie zum Zentralnervensystem. Die pharmakologischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften von MNH sowie sein Wirkungsmechanismus sind von DRUCKREY et al. (1965) beschrieben worden. Verschiedene Applikationsformen wurden von THOMAS et al. (1967), STAVROU (1970) und JÄNISCH et al. (1970) erprobt. Morphologie und Klassifizierbarkeit der bevorzugt im Gehirn, weniger häufig in Rückenmark und peripherem Nervensystem lokalisierten Tumoren nach histologischen, enzymhistochemischen und immuncytochemischen Gesichtspunkten wurden unter anderem von THOMAS u. KERSTING (1964), IVANKOVIC (1967), JÄNISCH u. SCHREIBER (1969), WECHSLER et al. (1969), STAVROU (1971), STAVROU u. HAGLID (1973) und KLEIHUES et al. (1976) ausführlich erörtert. MNH-induzierte Tumoren werden mit Hilfe der von KERSTING (1961) und MANUELIDIS (1965) an menschlichen Glioblastomen erarbeiteten Explantat-Technik erfolgreich in vitro gezüchtet. Seither wurde die Züchtung dieser Tumoren u. a. durch die Stabilisierung der Kulturen nach alternierenden in-vitro/in-vivo-Wechselpassagen (BENDA et al., 1968, 1971), die Etablierung permanenter Zellinien und die Bildung von Zellklonen (SCHMIDEK et al., 1971; STAVROU et al., 1979) weiterentwickelt. Von besonderer Wichtigkeit für die Verwendung experimenteller Hirntumoren als Modelltumoren ist zum einen die weitgehende morphologische (JÄNISCH u. SCHREIBER, 1969;

WECHSLER et al., 1969; STAVROU, 1971) enzymhistochemische (STAVROU u. DAHME, 1969; STAVROU, 1969, 1971) und immuncytochemische (BENDA et al., 1968; STAVROU u. HAGLID, 1973; STAVROU et al., 1974) Übereinstimmung der MNH-induzierten Tumoren mit den spontanen neurogenen Tumoren von Mensch und Tier. Zum anderen sind nitrosamidinduzierte Tumoren den Spontantumoren auch immunologisch insoweit vergleichbar, als die sowohl im autologen (STAVROU,1976; STAVROU et al., 1977, 1978) als auch im syngenen (CRAVIOTO, 1978) bzw. xenogenen System (LIM u. KLUSKENS, 1970; DAY u. BIGNER, 1973) nachgewiesenen Immunreaktionen den bei spontanem Gliomwachstum erhobenen immunologischen Befunden zumindest ähneln (Lit. bei WATERS, 1978).

2. Modifikation tumorassoziierter Antigene

Verschiedene Reagenzien, die definierte chemische Reaktionen mit Proteinen eingehen, wurden auf ihre Eignung, die an sich schwache Immunogenität von Tumorzellen zu steigern, geprüft (Lit. bei PRAGER u. BAECHTEL, 1973). Die von KLEIN (1969) vorgeschlagene Koppelung von DNP-Gruppen an Zellmembranproteine erwies sich bisher in zahlreichen Untersuchungen als effektiv. SHEARER (1974) konnte zeigen, daß Milzzellen, die in vitro mit Trinitrophenylsulfonsäure (TNBS) inkubiert worden waren, zwar nicht spezifisch gegenüber dem TNBS, wohl aber gegen durch Modifikation veränderte Oberflächenantigene reagierten. BURAKOFF et al. (1976) und LEMONNIER et al. (1977) wiesen gezielte Reaktionen von T-Lymphocyten gegen TNBS-modifizierte Antigene nach, SHERMAN et al. (1979) induzierten ebenfalls spezifische cytotoxische Reaktionen von T-Zellen mit TNBS-modifizierten Membranen. GALILI et al. (1976) verstärkten

die Immunantwort in einem wenig reaktiven System durch die Antigen-Modifikation mit TNBS. STAVROU et al. (1980) konnten die Steigerung der humoralen Immunantwort bei syngenen Tieren durch die Immunisierung mit TNBS-modifizierten Gliomzellen nachweisen.

Eine weitere wirksame Methode, die Antigenität von Tumorzellen zu verstärken, ist die Behandlung mit Dimethylsulfat (DMS, STAAB u. ANDERER, 1976), das sich ebenfalls mit Proteinen der Oberflächenmembran verbindet. Über die Hälfte der Tiere, die mit DMS-modifizierten Zellmembranen immunisiert worden waren, bildete eine belastbare Immunität aus (STAAB u. ANDERER, 1978).

3. Zelluläre Antikörper

Die Bedeutung zellulärer Antikörper für die immunologische "Surveillance" des Tumorwachstums ist sowohl durch die Übertragung reaktiver Immunzellen (BILLINGHAM et al., 1954; KLEIN u. SJÖGREN, 1960; BAKER et al., 1962) als auch durch die Beobachtung cytotoxischer Reaktionen in vitro hinlänglich nachgewiesen. Wichtige Testverfahren wurden von HELLSTRÖM et al.(1969, 1971) mit dem "Colony Inhibition"-Test und von TAKASUGI u. KLEIN (1970) mit dem Mikrocytotoxizitätstest, der von HELLSTRÖM u. HELLSTRÖM (1971) modifiziert wurde, eingeführt. Beide Testverfahren bestimmen Cytotoxizität, Wachstumshemmung, Zellablösung und "Colony-Inhibition". Mit diesen Tests wurden zelluläre Immunreaktionen sowohl gegen spontane als auch gegen experimentelle Hirntumoren beobachtet (KUMAR u. TAYLOR, 1973; LEVY et al., 1972; WAHLSTRÖM et al., 1973; WOOSLEY et al., 1977). In jüngster Zeit wurden überzeugende ultra-

strukturelle Befunde lymphocytotoxischer in-vitro-Reaktionen (SANDERSON, 1976; RYSER et al., 1977; GRIMM et al., 1979) mitgeteilt. PROCICCHIANI et al. (1979) konnten auf diese Weise Interaktionen zwischen Neuroblastomzellen und syngenen Milzzellen zeigen.

4. Anreicherung von Lymphocyten

Alle in der Literatur beschriebenen Anreicherungsverfahren für Lymphocyten mittels kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Dichtegradienten gehen im wesentlichen auf die grundlegenden Arbeiten BØYUMS (1964, 1968, 1976) zurück. BØYUM isolierte über einen diskontinuierlichen Ficoll-Isopaque Gradienten mit der Dichte 1,077 g/ml Lymphocyten aus menschlichem Blut und Knochenmark. WIGZELL (1970), SHORTMAN (1972), LOOS u. ROOS (1974) modifizierten dieses Verfahren und erweiterten seine Anwendungsmöglichkeiten auf die Anreicherung von Lymphocyten aus anderen Organen. Wesentlich vereinfacht wurde die Technik der Gradienten-Sedimentation durch Percoll(R), ein Medium, das durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung auf die jeweils erforderliche Dichte eingestellt werden kann. Einzelheiten wurden von ULMER u. FLAD (1979) beschrieben. Auch für eine Anreicherung von Lymphocyten aus Tumorgewebe wird - neben der Elektrophorese (Lit. bei PRETLOW et al., 1975) - vor allem die Gradienten-Sedimentation empfohlen. HOLDEN et al. (1976), RUSSEL et al. (1977), VOSE et al. (1977) und SVENNEVIG et al. (1978) verwendeten entweder kontinuierliche oder diskontinuierliche Gradienten und konnten Lymphocyten und auch Makrophagen in verschiedenen Schritten isolieren. Die Hauptschwierigkeit bei der Gewinnung von Lymphocyten aus Tumorgewebe besteht in der vorausgehenden

Dissoziation des Tumors. Durch keine der bisher erarbeiteten enzymatischen oder mechanischen Zerkleinerungsmethoden wird dieses Problem zufriedenstellend gelöst (RUSSEL et al., 1980).

PROBLEMATIK

Obwohl gezeigt werden konnte, daß Rundzellinfiltrate in menschlichem und experimentellem Gliomgewebe in überwiegendem Maße aus T-Lymphocyten bestehen (STAVROU et al., 1977), fehlen - im Gegensatz zu den in vitro nachgewiesenen gliomcytotoxischen Lymphocytenreaktionen - bisher überzeugende Hinweise für wirksame zelluläre Reaktionen gegen Gliomzellen in vivo. Die Reaktionsbereitschaft des Immunsystems scheint während des Gliomwachstums sogar geschwächt zu sein (Lit. bei WATERS, 1978).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollte die Reaktivität von Lymphocyten aus Gliomgewebe, Blut, Milz, Thymus und Lymphknoten von tumortragenden Tieren während verschiedener Stadien des Tumorwachstums mit unterschiedlichen immunologischen Techniken qualitativ und quantitativ erfaßt werden.

Da es sich bei gliomassoziierten Antigenen in der Regel um schwache Antigene handelt (CORNAIN et al., 1975; STAVROU et al., 1979), wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Antigenität nitrosamidinduzierter Gliome zu steigern. Verschiedene Immunisierungsverfahren sollten erprobt werden, um mittels chemisch modifizierter Gliomzellen meßbare lymphocytäre Reaktionen gegen Gliomzellen zu erzeugen. Damit sollte geprüft werden, ob und unter welchen Bedingungen gliomassoziierte Antigene vom Immunsystem erkannt und gezielt beantwortet werden. Entwicklung und Verlauf der zellulären Immunantwort sollten verfolgt werden, um die Funktion von gliomassoziierten Antigenen und Lymphocyten während der Gliom/Wirt-Auseinandersetzung besser definieren zu können.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Inzucht-Fischer-Ratten (F344) beiderlei Geschlechts im Alter von 2 - 52 Wochen. Sie wurden unter gleichen Bedingungen in Macrolon(R)-Käfigen gehalten und erhielten eine Standarddiät (Altromin (R)) und Wasser ad libitum.

2. Tumoren

2.1. Tumorinduktion

Die diesen Untersuchungen zugrundeliegenden experimentellen Hirngeschwülste wurden durch systemische perorale Gaben von N-Methyl-N-nitrosoharnstoff (MNH) (DRUCKREY et al., 1965) induziert. Vom sechsten Lebensmonat an bekamen die Tiere einmal wöchentlich 6 mg/kg MNH in einer wäßrigen, mit 1 %igem primären Natriumphosphat auf einen pH von 6,2 gepufferten Lösung (THOMAS et al., 1967). Einzelheiten über die Applikationsart und -dauer, die Induktionszeit, Tumorrate etc. wurden bereits veröffentlicht (STAVROU, 1970). Bei den ersten Anzeichen zentralnervöser Störungen wurden die Tiere euthanasiert und unmittelbar danach deren Zentralnervensystem entnommen.

2.2. Primärtumoren und permanente Zellinien

Aus neun induzierten Primärtumoren des Hirns, die histologisch, elektronenmikroskopisch und immuncytochemisch charakterisiert wurden, konnten folgende permanente Zellinien etabliert werden:

a) 78FR-G-219 (Fischer-Ratte-Gliom, Tagebuch-Nr. 219/78): Die Primärkultur wurde aus einem in der linken Großhirnhemisphäre lokalisierten, als pleomorphes Gliom diagnostizierten Tumor gezüchtet. Die aus dieser Linie isolierten Zellklone werden unter der Bezeichnung 78FR-G-219C geführt.
b) 78FR-G-284: Diese Zellinie wurde aus einem in der Pons gelegenen Tumor, der als pleomorphes Mischgliom (Mischgliom II) klassifiziert wurde, isoliert.
c) 78FR-G-299: Die Primärkultur konnte aus einem in der linken Hemisphäre des Großhirns lokalisierten Astrocytom (I-II) etabliert werden.
d) 78FR-G-344: Die Linie stammt aus einem pleomorphen Mischgliom (Mischgliom II) in der rechten Großhirnhemisphäre.
Neben den permanenten Zellinien aus den Ursprungstumoren wurden aus intracerebralen oder subkutanen Transplantationstumoren die permanenten Linien 78FR-G-219T und 78FR-G-299T etabliert.

2.3. Transplantationstumoren

Zur Prüfung der Tumorogenität und zur Stabilisierung der in vitro etablierten Zellinien sowie für histologische bzw. ultrastrukturelle Untersuchungen wurden regelmäßig Transplantationstumoren angelegt.

2.3.1. Intracerebrale Transplantate

Um intracerebrale Transplantationstumoren zu erzeugen, wurden Zellen der permanenten Linien abtrypsiniert, in PBS-A gewaschen und im Coulter-Counter (Coulter Electronics, Herts, England) gezählt. 1 x 10^5 - 10 x 10^6 Zellen wurden in 50 µl PBS-A suspendiert und bei 2 Wochen alten Ratten mittels einer No. 17-Injektionsnadel - nach Perforation der Schädeldecke - paramedian in Höhe des Scheitelbeins in der Großhirnrinde inokuliert. Darüberhinaus wurde auch suspendiertes Biopsiematerial aus intracerebralen und subkutanen Transplantaten intracerebral appliziert.

2.3.2. Subkutane Transplantate

Für das Wachstum subkutaner Transplantationstumoren erwies sich die Region dorsal zwischen den Schulterblättern (regio dorsoscapularis) für die Versuchstiere als günstig. Um Gliome für die Anreicherung tumorinfiltrierender Lymphocyten zu erzeugen, wurden bis zu 20 x 10^6 Gliomzellen subkutan transplantiert.

2.4. Histologische Untersuchungen

Gewebeproben der Ursprungstumoren, der Transplantationstumoren und der Tumormetastasen wurden für die lichtmikroskopische Untersuchung in 6 %igem neutralen Formol fixiert und in Paraplast eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxilin-Eosin oder nach NISSL gefärbt. Die permanenten Zellinien wurden nach jeder 5. in-vitro-Passage auf Zellmorphologie bzw. Wachstumscharakteristika untersucht. Dazu wurden Lamellenkulturen in "Leighton-tubes" oder Flaschenkulturen in situ

mit PBS-A (Ca^{++}- und Mg^{++}-ionenfreie phosphat-gepufferte Saline, pH 7,2) gewaschen, in BOUIN-Lösung fixiert und nach den üblichen Verfahren mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt.

2.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die ultrastrukturelle Untersuchung wurden Tumorproben in 6,25 %igem Glutaraldehyd fixiert, in Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschen (pH 7,4), in 1 %igem Osmiumtetroxyd nachfixiert, in Aceton dehydriert und in Epon eingebettet.

Kulturen der permanenten Zellinien wurden in situ mit PBS-A gewaschen, in 2,5 %igem Glutaraldehyd fixiert, erneut mit PBS-A gewaschen und in 1 %igem Osmiumtetroxyd nachfixiert. Nach der Dehydrierung mit Alkohol wurden sie in Epon eingebettet.

Semidünnschnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt und Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

2.6. Tumorzellkulturen

2.6.1. Primärkulturen und Kulturen aus Transplantationstumoren

Unter sterilen Bedingungen entnommenes Tumorgewebe wurde in Form stecknadelkopfgroßer Partikel in Gewebekulturflaschen (NUNC 1460, Roskilde, Dänemark) explantiert. Nach dem Anhaften auf der Wuchsfläche wurden die Explantate mit Medium überschichtet und im geschlossenen System oder in einer 5 %igen CO_2-Atmosphäre mit 95 % Luftfeuchtigkeit bei 37°C inkubiert. Primärkulturen wurden in Medium 199/Hanks mit einem Zusatz von Antibiotika (100 I.E. Penicillin/ml, 100 µg Dihydrostrepto-

mycin/ml, 65 I.E. Neomycinsulfat/ml), 1 % einer 8,8 %igen $NaHCO_3$-Lösung und 20 % fetalem Kälberserum (FKS, Seromed, München) angezüchtet.

2.6.2. Zellinien

Der aus den Explantaten auswachsende Zellrasen wurde nach der Trypsinierungsmethode (MARCUS et al., 1956; HAYFLICK u. MOORHEAD, 1961) 1 : 2 geteilt, und die Zellen im geschlossenen System bei 37°C inkubiert. Monolayerkulturen wurden regelmäßig im Verhältnis 1 : 5 bis 1 : 20 subkultiviert. Subkulturen wurden mit Dulbecco's modified Eagle Medium mit Glucose und Glutamin (DMEM, Gibco, Grand Island, N.Y., USA) unter Zusatz von Antibiotika und $NaHCO_3$, entsprechend den Primärkulturen, sowie mit 10 % fetalem Kälberserum gefüttert.

2.6.3. Zellklone

Aus der 10., 20. und 40. in-vitro-Passage der permanenten Linie 78FR-G-219 wurden mit Hilfe der Verdünnungsmethode Zellklone isoliert (STAVROU et al., 1979) und zwei bis dreimal subkloniert. Die Subklone wurden hinsichtlich Zellmorphologie und Wachstumseigenschaften untersucht und als permanente Zellinien weitergezüchtet.

2.6.4. Konservierung

Alle vier bis acht Wochen wurden Zellen unter Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) durch Tiefgefrieren bei -90°C konserviert und gelagert (ASHWOOD-SMITH, 1961; DOUGHERTY, 1962). Für eine kurzdauernde Aufbewahrung wurden Einschichtzellkulturen lichtgeschützt bei Raumtemperatur über 2 - 4 Wochen gelagert.

2.6.5. Nachweis gliaspezifischer Proteine

Die gliaspezifischen Proteine S-100* und GFAP** wurden mit der indirekten Immunofluoreszenz-Technik (Sandwich-Technik, COONS, 1957) immuncytochemisch nachgewiesen. Subkonfluente Kulturen auf Glaslamellen ("cover slips") wurden mit kaltem Azeton (+4°C) fixiert, mit Anti-S-100 oder Anti-GFAP (1 : 16) überschichtet und bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 30 Minuren wurden sie 3 x 5 Minuten in PBS-A gewaschen, getrocknet und mit FITC***-gekoppeltem Schaf-Anti-Kaninchen-Globulin (1 : 32, Meloy Laboratories, Springfield, Il., USA) für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Präparate mit den durch die entsprechenden Antigene absorbierten Antiseren bzw. mit normalem Kaninchenserum und Konjugat inkubiert.

Angaben über die Isolierung der gliaspezifischen Antigene sowie über die Gewinnung der entsprechenden Antiseren finden sich bei HAGLID und STAVROU (1973).

2.7. Tumorogenität

Die Mindestzellzahl, die transplantiert werden mußte, um intracerebrale und/oder subkutane Tumoren zu erzeugen, wurde für Primärkulturen und nach jeder 10. in-vitro-Passage der Gliomzellinien ermittelt. Die Mindestzellzahl wurde als Parameter für die Beurteilung der Tumorogenität einer Zellinie miteinbezogen. Weitere Beurteilungskriterien waren die Latenzzeit von

---

* S-100 = "soluble in 100 % Ammoniumsulfate"
** GFAP = "glial fibrillary acidic protein"
*** FITC = "Fluoresceinisothiocyanat"

der Transplantation bis zum Auftreten zentralnervöser Störungen bzw. bis zu einem feststellbaren Tumorwachstum, die Wachstumsgeschwindigkeit bzw. Rückbildungsrate der Transplantationstumoren sowie ihre Neigung zu infiltrativem Wachstum und zur Metastasierung.

3. Hirnzellkulturen

Normales Hirngewebe von Rattenfeten, neugeborenen und adulten Ratten wurde steril entnommen, nach der Explantat-Technik angezüchtet und bis zur 10. Passage kultiviert. Für Hirnzellkulturen wurde ausschließlich Medium 199/Hanks mit einem Anteil von 20 % FKS verwendet. Monolayerkulturen wurden nach der Trypsinierungsmethode 1 : 2 bis 1 : 5 geteilt und bei 37°C im geschlossenen System inkubiert.

4. Immunisierungen

4.1. Chemische Modifikation

Gliomzellen und normale Hirngewebszellen wurden mit Dimethylsulfat (DMS, STAAB u. ANDERER, 1976, 1977) oder mit Trinitrophenylsulfonsäure (TNBS, LEMONNIER et al., 1977) behandelt. Mechanisch geerntete Zellen wurden dreimal in eiskaltem PBS-A gewaschen und resuspendiert. Jeweils 5 x 10^6 Zellen in 0,1 ml PBS-A wurden in 1 ml der DMS-Lösung (50 mM DMS in PBS-A mit 5 % Glycerol und 5 % Äthanol, pH 7,3) oder in 0,1 ml der TNBS-Lösung (10 mM TNBS mit 0,05 M Na_2HPO_4 auf pH 7,4 gepuffert) suspendiert und für 10 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen, mit der Trypanblau-Exklusionsmethode auf ihre Vitalität getestet und auf ihre Vermehrungsfähigkeit in vitro untersucht. Zellsuspen-

sionen mit über 70 % lebenden und vermehrungsfähigen Zellen wurden für die Immunisierung verwendet.

4.2. Immunisierungsverfahren

Zwei bis drei Monate alte Ratten wurden zum einen mit unbehandelten und zum anderen mit chemisch modifizierten Gliomzellen immunisiert. Die zu verabreichende Antigendosis wurde - abhängig von der Tumorogenität der verwendeten Zellinie - variiert. Native Zellen wurden knapp unterhalb der Mindestzellzahlgrenze, chemisch modifizierte Zellen in Höhe der Mindestzellzahl inokuliert. Bei einigen Immunisierungsverfahren wurden die Tiere mit bis zu 10×10^6 unbehandelten, durch hohe in-vitro-Passageraten "attenuierten" Gliomzellen geboostert. Für Kontroll-Immunisierungen wurden kultivierte normale Hirngewebszellen verwendet (Tab. 1).

4.3. Applikationsart

Mechanisch geerntete native bzw. modifizierte Zellen wurden in PBS-A resuspendiert und in 0,1 ml subkutan appliziert. Das erste Inokulum wurde dorsal zwischen die Schulterblätter, das zweite und dritte in die rechte bzw. linke Flanke, die Zellen für die Boosterung wieder zwischen die Schulterblätter injiziert.

Tabelle 1 Immunisierung syngener Ratten mit verschiedenen Antigenpräparationen

Gruppe	Zellinie	Passage	Zellantigen / Reagenz	Immunisierungs-zeit in Tagen
I	78FR-G-219	30 - 36	0,5-1x10^6 Zellen + DMS	1. 8. 15.
	78FR-G-219T	15	0,5-1x10^6 Zellen	29.
II	78FR-G-219	15 - 32	1x10^6 Zellen + DMS	1. 36.
	78FR-G-219	19 - 36	1x10^6 Zellen	15. 50.
III	78FR-G-219	52 - 56	0,5-1x10^6 Zellen + DMS + CFA*	1. 8. 15.
	78FR-G-219	59	0,5-1x10^6 Zellen	29.
IV	78FR-G-219T	42 - 47		
	78FR-G-284	54 - 61	1x10^6 Zellen + TNBS	1. 8. 15.
	78FR-G-344	60 - 66	1-10x10^6 Zellen	29.
	78FR-G-299T	34 - 41		
V	78FR-G-219	58 - 62	1x10^6 Zellen + TNBS	1. 8. 15.
	78FR-G-219T	45	1x10^6 Zellen + DMS	29.
VI	78FR-G-219T	2 - 8	0,5-1x10^6 Zellen	1. 8. 15.
	78FR-G-299T		0,5-1x10^6 Zellen	29.
VII		2 - 8	Hirnzellen + TNBS	1. 8. 15.
		10	Hirnzellen	29

*CFA: Komplettes Freund'sches Adjuvanz

5. "Challenge"

5.1. Tumorträger

Vier Wochen nach der Exzision eines subkutanen Transplantationstumors wurde die Anzahl tumorogener Gliomzellen s. c. appliziert, die bei der ersten Transplantation den Tumor erzeugt hatte.

5.2. Regressortiere

Tieren, bei denen einer Phase progredienten Tumorwachstums eine Regression bis zur vollständigen Rückbildung des Tumors gefolgt war, wurden drei bis sechs Monate später bis 50 x 10^6 tumorogene Zellen transplantiert.

5.3. Immunisierte Tiere

Die Belastbarkeit der Immunität wurde in einem Zeitraum von zwei bis zwölf Wochen nach der Boosterung untersucht. Dazu wurde eine zur Erzeugung eines Tumors ausreichende Zellzahl, die je nach der Tumorogenität der einzelnen Linien variiert werden mußte, s. c. appliziert. Eine mögliche Kreuzreaktivität wurde durch "Challenge" mit einer anderen als der zur Immunisierung verwendeten Linie geprüft.

6. Anreicherung von Lymphocyten

6.1. Lymphocyten aus dem peripheren Blut

Das Blut wurde von narkotisierten Ratten durch Herzpunktion mit heparinisierten Einmalspritzen (100 I.E. Heparin/ml) gewonnen. Das heparinisierte Blut wurde mit DMEM/10 % FKS im Verhältnis 1 : 3 verdünnt und in silikonisierten 10 ml-Zentrifugenröhrchen im Verhältnis 2 : 1 über einen diskontinuierlichen Ficoll-Gradienten (Seromed, München) geschichtet (BØYUM, 1968). Nach einer Zentrifugation von 30 Minuten bei 400 g und 20°C wurden die Zellen, die sich auf dem 1,077 g/ml Gradienten abgelagert hatten, abgesaugt, dreimal in kaltem PBS-A gewaschen und in Medium/20 % FKS suspendiert. Vorhandene Erythrocyten wurden mit 0,83 %igem Ammoniumchlorid lysiert. Durch eine Inkubation in Plastikgewebekulturflaschen über 60 Minuten bei 37°C wurden plastikadhärente Zellen entfernt. Die Fraktion der nicht-adhärenten Zellen enthielt über 97 % Lymphocyten und Monocyten bei einer Vitalität von über 95 %. Die Lymphocyten wurden auf eine Zellzahl von 3×10^6/ml eingestellt und bis zur weiteren Verwendung in Medium 199/Hanks mit 20 % FKS bei 37°C aufbewahrt.

6.2. Lymphocyten aus der Milz, den Lymphknoten und dem Thymus

Narkotisierten entbluteten Ratten wurden unter sterilen Kautelen Milz, Thymus und Lymphknoten aus dem Halsbereich sowie Axillar- und Mesenteriallymphknoten entnommen, von Fettgewebe und Blutresten gereinigt und - einzeln - in einem silikonisier-

ten Glashomogenisator in DMEM/10 % FKS homogenisiert. Die Suspensionen wurden durch eine dreifache Mullage gefiltert, auf eine Zellzahl von 10 x 10^6/ml eingestellt und Lymphocyten aus diesen Suspensionen - wie oben für die Blutlymphocyten beschrieben - über einen Ficoll-Gradienten angereichert. Die Vitalität in den Lymphocytensuspensionen lag bei über 95 %.

6.3. Lymphocyten aus Gliomgewebe

6.3.1. Tumorzellsuspensionen

Operativ entfernte Tumoren und Tumoren von euthanisierten, entbluteten Ratten wurden gewogen, von cystischen und nekrotischen Anteilen sowie von größeren Blutgefäßen und Blutresten befreit und mit einer Schere zu reiskorngroßen Partikeln zerschnitten. Das überwiegend weiche bis schwammige Gliomgewebe erlaubte eine weitere mechanische Zerkleinerung im Glashomogenisator in DMEM/10 % FKS bis zur Homogenisierung, so daß von einer enzymatischen Dissoziation abgesehen werden konnte. Die Suspensionen wurden durch Mull gefiltert und auf eine Zellzahl von 10 x 10^6 eingestellt. (Lit. bei HANNA u. WITZ, 1980). Sie enthielten zwischen 70 und 80 % lebende Zellen.

6.3.2. Tumorinfiltrierende Lymphocyten

Lymphocyten aus Tumorzellsuspensionen wurden entsprechend den von PRETLOW u. BOONE (1969); ZETTERGREN et al. (1973); RUSSEL et al. (1976); VOSE et al. (1977) und SVENNEVIG et al. (1978) beschriebenen Verfahren angereichert. Die Einzelzellsuspensionen wurden in silikonisierten 10 ml-Zentrifugenröhrchen über mehrere Percoll$^{(R)}$-Gradienten von 1,052 g/ml - 1,085 g/ml Dichte gelagert und 30 Minuten bei 400 g zentrifu-

giert. Der Lymphocytensaum über dem 1,077 g/ml-Gradienten wurde abgesaugt und in gleicher Weise weiterbehandelt wie für die Blutlymphocyten beschrieben. Die Vitalität in den Lymphocytensuspensionen schwankte zwischen 80 und 85 %.

6.4. Gemischte Lymphocytenkulturen

Lymphocyten wurden in Suspensionskulturen in Medium 199/Hanks mit 20 % FKS und Antibiotika bei 37°C im geschlossenen System über 10 Tage gehalten. Lymphocyten für die in-vitro-Tests wurden nicht länger als 24 Stunden aufbewahrt.

6.5. Trennung von B- und T-Lymphocyten

Zur Fraktionierung von B- und T-Lymphocyten wurde die von WYSOCKI u. SATO (1978) beschriebene Methode adaptiert. 1 - 2 ml eines 1 : 20 in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 9,5) verdünnten Anti-Ratten-IgG-Serum wurden in Plastikgewebekulturflaschen pipettiert, gleichmäßig verteilt und 40 Minuten bei Raumtemperatur an lichtgeschützter Stelle inkubiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und die Flaschen zweimal mit kaltem PBS-A und einmal mit kaltem PBS-A/1 % FKS gewaschen. Je Flasche wurden10 ml Lymphocytensuspension mit 2×10^6 Zellen/ml auf die so vorbehandelten Wuchsflächen pipettiert, verteilt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 40 Minuten wurden die Flaschen vorsichtig bewegt, um die Lymphocyten erneut zu verteilen und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach der Inkubation wurden die nicht-adhärenten Zellen - überwiegend T-Lymphocyten (WYSOCKI u. SATO, 1978) - abpipettiert, die adhärenten B-Lymphocyten konnten mit einer Pasteurpipette von der Haftfläche heruntergespült werden. Von den Milzlymphocyten waren etwa

50 % adhärent, von den Lymphocyten aus dem Blut und den Lymphknoten etwa 30 - 40 % und von den Thymocyten unter 5 %. Lymphocyten aus Gliomgewebe konnten nur bei einem Versuch aus mehreren über 14 g schweren Tumoren in einer für das Trennungsverfahren ausreichenden Menge gewonnen werden. Hier betrug der Anteil an adhärenten Zellen 24 %. Die getrennten Lymphocytenfraktionen wurden suspendiert, auf eine Zellzahl von 3 x 10^6/ml eingestellt und wie die gemischten Lymphocytenkulturen im geschlossenen System bei 37°C in Medium 199/Hanks mit 20 % FKS inkubiert.

7. Reaktionen von Lymphocyten gegen Gliomzellen in vitro

7.1. Lymphocyten-Mikrocytotoxizitäts-Test (LMC)

Cytotoxische Reaktionen von Lymphocyten gegen Gliomzellen in vitro wurden mit Hilfe des Microcytotoxizitätstests von TAKASUGI u. KLEIN (1970), modifiziert von HELLSTRÖM u. HELLSTRÖM (1971), untersucht.

500 frisch abtrypsinierte Gliomzellen in 10 µl DMEM/20 % FKS wurden pro Vertiefung der Terasaki-Mikrotiterplatten mit ebenem Boden (NUNC, Roskilde, Dänemark) ausgesät. Nach 30 Minuten Bebrütung bei 37°C hatten sich die Zellen abgesetzt und wurden mit 5 ml Medium/20 % FKS je Platte überschichtet. Um die Platten dicht zu verschließen, wurde mit einer Injektionsspritze ein gleichmäßig dünner Film Silikonfett (Wacker-Chemie, München) an den Deckelinnenkanten aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 20 bis 24 Stunden bei 37°C waren 150 - 200 Zellen/Vertiefung angewachsen und hatten sich ausgebreitet. Das Medium wurde dekantiert und durch 10 µl Lymphocytensuspension mit 3 x 10^4 Zellen pro Vertiefung ersetzt.

Nach einer 18 - 24-stündigen Inkubation bei 37°C im geschlossenen System wurde das Medium dekantiert und die Kokultivation durch Zugabe von kaltem PBS-A/1 % FKS beendet. Der Test wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop (ZEISS ICM 405) bei 200facher Vergrößerung ausgewertet. Die cytotoxische Reaktivität wurde auf der Grundlage von Kontrollversuchen mit Lymphocyten unbehandelter Tiere quantifiziert und als cytotoxischer Index (I_c) (WOOD u. MORTON, 1979; KORNBLITH et al., 1974) berechnet.

$$I_c = 1 - \frac{\text{lebende Zellen im Test}}{\text{lebende Zellen in der Kontrolle}}$$

Als Bezugswert für die Berechnung des I_c gliominfiltrierender Lymphocyten wurde der Durchschnitt lebender Zellen in den Kontrollversuchen mit Lymphocyten aus Blut, Milz, Lymphknoten und Thymus gewählt.

7.2. Colony-Inhibition-Test (CI)

Für den Colony-Inhibition-Test (HELLSTRÖM, 1967; HELLSTRÖM et al., 1969,1971) wurden 1500 - 2000 Gliomzellen pro Gewebekulturflasche ausgesät und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Absetzen der Zellen wurden je Flasche 10 ml Medium mit 20 % FKS zugegeben. Dieser Ansatz bildete nach 4 - 5 Tagen im Brutschrank bei 37°C 100 - 300 Kolonien/Flasche. Für den Test wurde 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen das Medium entfernt, in jede Flasche 2 ml Lymphocytensuspension mit 3 x 10^6 Zellen/ml pipettiert, zunächst 45 Minuten, und dann, nach Zugabe von 10 ml Medium/20 % FKS, drei bis fünf Tage bei 37°C im geschlossenen System inkubiert. Danach wurde der Test durch Zugabe von kaltem PBS-A unterbrochen

und im Phasenkontrastmikroskop am nativen Präparat ausgewertet. Die Anzahl der Kolonien in den Testflaschen wurde verglichen mit der Anzahl der Kolonien in Kontrollflaschen, in denen Gliomzellen mit Lymphocyten unbehandelter Tiere kokultiviert worden waren, und errechnet, um wieviel Prozent die Kolonienbildung in den Testflaschen unterdrückt wurde.

7.3. Ultrastruktureller Nachweis von Zellinteraktionen

Milzlymphocyten immunisierter Tiere wurden nach dem üblichen Verfahren angereichert, im Verhältnis 30 : 1 bis 100 : 1 mit Gliomzellen in Medium/10 % FKS gemischt und 5 Minuten bei 100 g abzentrifugiert. Die Pellets wurden bei 37°C inkubiert, nach 1 bis 3 Stunden mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in 1 ml PBS-A resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 100 g erneut pelletiert, in 2 %igem Glutaraldehyd fixiert, in Epon eingebettet und die Ultradünnschnitte nach den üblichen Verfahren kontrastiert (GRIMM et al., 1979; PROCICCHIANI et al., 1979).

B. Ergebnisse

1. Lichtmikroskopische Befunde

1.1. Primärtumoren

Im histologischen Bild sind die vier Ursprungstumoren durch zellreiche Parenchyme mit teilweise abnormen Mitosefiguren, riesenzellähnliche Bildungen, Gefäßgirlanden und straßenartigen Nekrosen gekennzeichnet. Die Zell- und Kernpleomorphie ist unterschiedlich ausgeprägt. Bei dem pleomorphen Gliom 78/219 überwiegen vielgestaltige Zellformen vor fortsatzreichen astrocytären Elementen. Die Mischgliome 78/284 und 78/344 zeigen bei ähnlichem Grundaufbau ein von Areal zu Areal unterschiedliches Verteilungsmuster oligodendroglialer und astrocytärer Elemente. Der Tumor 78/299 (Astrocytom I-II) besteht überwiegend aus astrocytenähnlichen Zellen mit langen Fortsätzen und meist runden chromatinarmen Kernen in einem lockeren netzartigen Verband.

1.2. Transplantationstumoren und Tumormetastasen

Die intracerebralen Transplantate stimmen hinsichtlich ihrer Wuchsform und Cytomorphologie weitgehend mit ihren Ursprungstumoren überein. Nach wiederholten in-vivo-Passagen wurde das Erscheinungsbild einheitlicher, wobei die pleomorphen Elemente in den Hintergrund traten. Subkutane Transplantationstumoren sind von faserreichen bindegewebigen Bezirken durchsetzt und neigen dazu, das umgebende Muskelgewebe zu infiltrieren. Riesenzellen und z.T. konfluierende Herdnekrosen sind zahlreich. Die Tumormetastasen in den Axillar- und Brusteingangslymphknoten sowie in der Lunge bieten im Vergleich zu den Transplantationstumoren keine Besonderheiten.

1.3. Zellkulturen

Während der ersten 10 in-vitro-Passagen wuchsen die Rattengliome in Form von Mischkulturen unterschiedlicher Zelltypen mit einer auffallend hohen Proliferationsrate. Neben schlanken bipolaren und protoplasmareichen multipolaren Zellen mit langen, teilweise verzweigten Zellfortsätzen fanden sich große polygonale flachhaftende Zellen mesenchymalen Ursprungs und vereinzelt riesenzellähnliche Bildungen. Mit zunehmender Kultivationsdauer wurden die Zellpopulationen einheitlicher. Die grazilen bi- und multipolaren Zellen überwuchsen die fibroblastenartigen Zellen bis auf einen Anteil von 2 - 5 % an der Gesamtpopulation. Durch wiederholte intracerebrale Passagen wurde Ausgangsmaterial gewonnen, aus dem sich - ähnlich den aus der Kultur 78FR-G-219 isolierten Klonen - Kulturen aus überwiegend multipolaren cytoplasmareichen Zellen mit häufig exzentrisch liegendem bohnenförmigen Kern entwickelten. Mit zunehmender Kultivationszeit nahm die Eigenschaft der Zellen, lange Fortsätze zu bilden, ab. Etwa von der 50. Subkultur an bis zur 100. (78FR-G-344) bzw. 150. (78FR-G-219) Subkultur blieb die Morphologie der permanenten Linien weitgehend unverändert. Kulturen aus Transplantationstumoren verhielten sich wie die Kulturen aus den Ursprungstumoren, zeigten aber von Anfang an ein einheitlicheres Bild. Die Wachstumsgeschwindigkeit aller Kulturen blieb unverändert hoch, so daß eine 1 : 20 geteilte Einschichtkultur sich in 3 bis 4 Tagen erneuerte (Abb. 1 a - d).

2. Ultrastrukturelle Befunde

2.1. Tumoren

Elektronenmikroskopisch zeigen die vier Primärgliome und ihre Transplantationstumoren im wesentlichen das gleiche Bild:

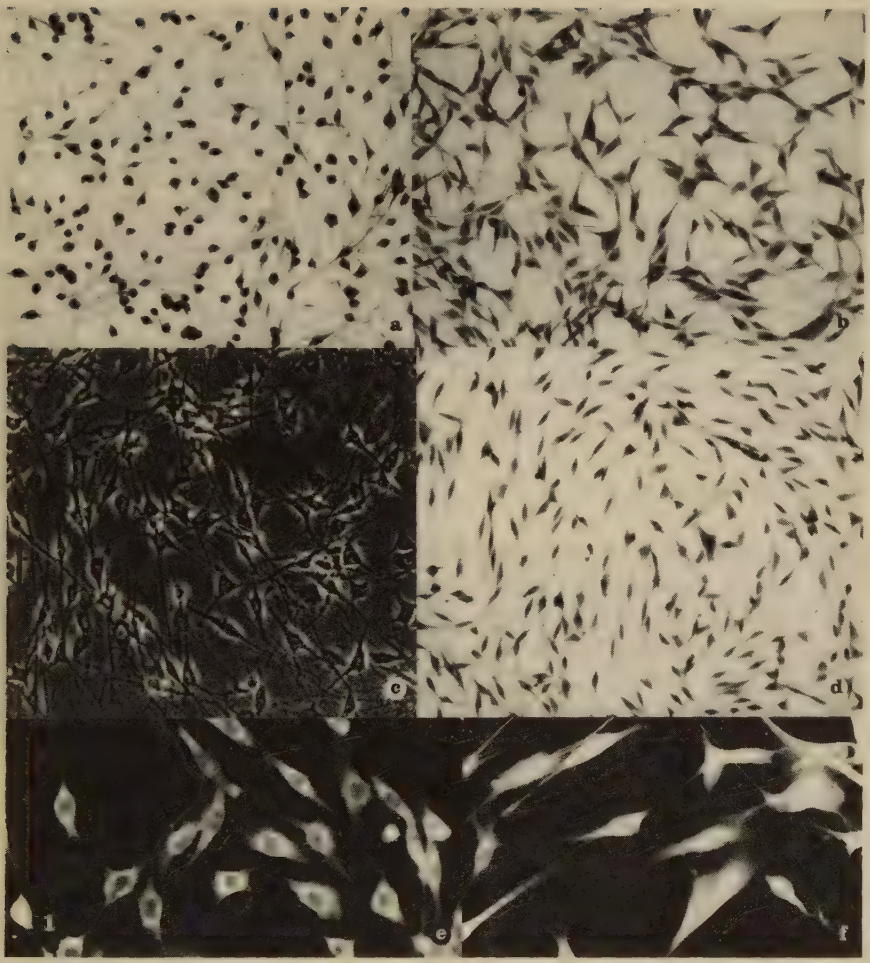

Abb. 1: Subkonfluente Kulturen der permanenten Gliomzellinien 78FR-G-344 (a), 78FR-G-284 (b), 78FR-G-299 (c) und 78FR-G-219T (d), sowie cytochemische Darstellung des S-100- (e) und des GFA-Proteins (f) mit Hilfe der Immunofluoreszenz (a, b, d: HE-Fbg. x120; c: Phasenkontrast x200; e, f x300).

Eine lockere Strukturierung pleomorpher oder multipolarer Zellen mit einem oder mehreren großen pleomorphen exzentrisch liegenden Kernen. Im Kern ist das Heterochromatin überwiegend marginal angeordnet, meist sind ein bis zwei Nukleoli erkennbar. Das Cytoplasma ist von geringer Dichte und reich an Organellen, wie gut entwickelten Golgi-Feldern, rosettenartig angeordneten Ribosomen und einem rauhen endoplasmatischen Retikulum. Charakteristisch ist ein dichter Verband unterschiedlich angeordneter Mikrotubuli. Astrocytenspezifische kernartige Verdichtungen (GAMBETTI et al., 1975) wurden in Zellen aller Tumoren gefunden.

2.2. Zellkulturen

Entsprechend den Primärtumoren ähnelt sich die Ultrastruktur der daraus gezüchteten permanenten Linien. Zellkerne und Zellkörperchen sind spindelförmig, zeigen aber den gleichen charakteristischen Aufbau wie die der Ursprungszellen. Die Kernmembran ist gut zu erkennen. Das Cytoplasma ist von mittlerer Dichte mit einem hohen Anteil an freien Ribosomen. Das Mikrofilamentnetz ist weniger deutlich ausgeprägt, Mikrotubuli und Zentriolen sind zahlreicher als in den Ursprungszellen. Die Zellmembran trägt lange tentakelartige Mikrovilli. Bei der Linie 78FR-G-219 fallen Gruppierungen besonders großer Mitochondrien vom Crista-Typ auf.

3. Gliaspezifische Proteine

Die meisten Zellen aller Gliomkulturen und alle Zellen der Linie 78FR-G-219C zeigen eine für das S-100 Protein spezifische Fluoreszenz. Diese Eigenschaft ist bei den späten Subkulturen der permanenten Linien stärker ausgeprägt als bei den Primärkulturen. Das ergibt sich aus dem vergleichsweise

hohen Anteil der Primärkulturen an epitheloiden großleibigen Zellen und Riesenzellen, die schwach oder überhaupt nicht fluoreszieren. Die stärkste Fluoreszenzintensität haben die grazilen bi- bzw. multipolaren Zellen (Abb. 1 e).

GFA-Protein läßt sich bei einer wechselnden Anzahl von Zellen der Linien 78FR-G-219, 78FR-G-284 und 78FR-G-344 nachweisen. Dagegen zeigen die Zellen der Kulturen 78FR-G-219C und -219T bzw. 78FR-G-299 und 78FR-G-299T eine mehr oder weniger gleichmäßige spezifische Fluoreszenz (Abb. 1 f).

4. Tumorogenität

4.1. Mindestzellzahlen

Bis zur 25. Subkultur entstanden Transplantationstumoren sowohl nach intracerebraler als auch nach subkutaner Inokulation von 1 x 10^6 Zellen der permanenten Linien aus den vier Ursprungstumoren. Danach nahm die Tumorogenität geringgradig ab, sodaß die Mindestzellzahl bis zur 30. Subkultur auf 5 x 10^6 erhöht werden mußte. Bis zur 50. Subkultur wurde die zu transplantierende Zellzahl auf 10 x 10^6 für intracerebrale, und auf bis zu 80 x 10^6 für subkutane Transplantationstumoren gesteigert. Ab der 60. Subkultur war die Erzeugung von Transplantationstumoren mit Zellen aus den Linien der Ursprungstumoren nur selten möglich. Diese Veränderung der tumorogenen Eigenschaft war in der Regel begleitet von Veränderungen der Zellmorphologie (siehe unter 1.2.). Die Abnahme der Tumorogenität konnte in jedem Fall durch in-vitro/in-vivo-Wechselpassagen wieder rückgängig gemacht werden.

Die aus intracerebralen oder subkutanen Transplantationstumoren sowie Klonen der Linie 78FR-G-219 gezüchteten Zelllinien erwiesen sich als tumorogener als die Zellinien der Ursprungstumoren. Aus den ersten 20 in-vitro-Passagen der Linien 78FR-G-219T, 78FR-G-299T und 78FR-G-219C konnten intracerebrale Transplantationstumoren mit 1 x 10^5, subkutane Transplantationstumoren mit 5 x 10^5 Zellen erzielt werden. Durch wiederholte in-vivo/in-vitro-Wechselpassagen konnte die Tumorogenität der Linie 78FR-G-219T soweit stabilisiert werden, daß die Mindestzellzahl bis zur bisher 70. Subkultur gleichbleibend bei 1 x 10^6 für die intracerebrale und 5 x 10^6 für die subkutane Transplantation liegt.

4.2. Tumorwachstum

Die intracerebrale Transplantation führte in den meisten Fällen innerhalb von 10 bis 14 Tagen zu deutlichen zentralnervösen Störungen und zu einem sichtbaren Tumorwachstum im Bereich der Injektionsstelle. Bei der Sektion fand sich das grauweiße glasige Tumorgewebe überwiegend im subpialen Raum, in Ventrikelnähe oder im Ventrikelsystem sowie in der Unterhaut über dem Injektionskanal.

Bei subkutaner Transplantation ließen sich bereits nach 4 - 7 Tagen an der Inokulationsstelle derbe knotige Gebilde von 0,5 - 1 cm Durchmesser palpieren, die sich bei Proberesektion als Tumorgewebe erwiesen. Innerhalb weiterer 14 - 21 Tage wuchsen die Tumoren bis zu 5 x 5 x 3 cm Größe und 14,5 g Masse an. Wurde das Tumorgewebe in diesem Stadium nicht reseziert, begannen die Tumoren das umliegende Gewebe zu infiltrieren und in die regionären Lymphknoten zu metastasieren. Bei 3 von 20 Tieren, die in moribundem Zustand getötet wurden, hatten sich Metastasen in den Lymphknoten des Brust- und Bauchraumes und in der Lunge gebildet. Die resezierten Tumoren bestanden

aus grauweißem speckigen Gewebe mit deutlicher Stromabildung und einer etwa 1 mm starken Kapsel. Bei größeren Tumoren fanden sich häufig cystische Gebilde und nekrotische Areale.

4.3. Spontane Rückbildung

Nach einer Anbildungszeit von 7 Tagen bei einem Durchmesser von 1 cm bildeten sich von 43 Transplantationstumoren der permanenten Linien aus den Ursprungstumoren 20 (46,5 %) spontan zurück. Von 74 Transplantationstumoren der permanenten Linien 78FR-G-219T, 78FR-G-299T sowie 78FR-G-219C bildeten sich nur 6 (8,1 %) zurück.

5. Immunisierungen

Bei 4 von 10 Tieren, die wiederholt jeweils mit DMS-modifizierten Zellen grundimmunisiert und dann mit nativen Zellen geboostert wurden, bildeten sich subkutane Tumoren im Injektionsbereich der Boosterungen.

Bei 10 Tieren, die mit DMS-modifizierten Gliomzellen und einem Zusatz von komplettem Freundschen Adjuvans (CFA)immunisiert wurden, kam es an allen Injektionsstellen zu z. T. progressivem Tumorwachstum.

Bei 109 Tieren, die am 1., 8., 15. und 29. Tag mit TNBS-modifizierten oder nativen Gliomzellen immunisiert worden waren, kam es zu keinem durch das Immunisierungsverfahren verursachten Tumorwachstum.

6. "Challenge"

6.1. Tumorträger

26 Tiere, die vier Wochen nach der Tumorresektion ein zweites Transplantat erhalten hatten, wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten beobachtet. Während des Beobachtungszeitraums konnte an den Inokulationsstellen keine Gewebsreaktion festgestellt werden.

6.2. Regressortiere

Bei 20 Tieren, bei denen sich nach der ersten Transplantation der Tumor spontan völlig zurückgebildet hatte, konnte auch bei erneuten Transplantationsversuchen mit erhöhten Zellzahlen nach drei bzw. sechs Monaten in keinem Fall ein Tumor erzeugt werden.

6.3. Immunisierte Tiere

Mit DMS-modifizierten Zellen immunisierte Tiere erhielten zwischen der 2. und 8. Woche nach der Boosterung Transplantationen von 20 x 10^6 Zellen der Linien 78FR-G-219 bzw. 78FR-G-219T. Transplantationen nach 2 Wochen führten bei 4 von 10 Tieren zum Tumorwachstum. Bei Transplantationen 8 Wochen nach der Boosterung bildeten sich in 3 von 6 Fällen Tumoren, die aber innerhalb weniger Wochen vollständig zurückgebildet wurden. Tiere, die mit TNP-modifizierten Gliomzellen immunisiert worden waren, erhielten 2, 4, 8 und 12 Wochen nach der Boosterung zwischen 5 und 20 x 10^6 Zellen der Linie, mit der sie immunisiert worden waren. Lediglich bei Transplantationen von 20 x 10^6 Zellen der Linien 78FR-G-219T und 78FR-G-299T 2 Wochen nach der Boosterung bildeten sich

bei 3 von 15 Tieren Tumoren. In allen anderen Fällen kam es nicht zum progressiven Tumorwachstum. Einzelne Tumoren stagnierten in ihrem Wachstum oder bildeten sich zurück.

Zur Prüfung möglicher kreuzreagierender Antigene wurden 8 Wochen nach der Boosterung jeweils 20 x 10^6 Zellen einer anderen als der Immunisierungslinie inokuliert. Dabei wuchsen nur nach Transplantationen der Linien 78FR-G-299 und 78FR-G-299T Tumoren.

7. Reaktivität von Lymphocyten gegen Gliomzellen in vitro

7.1. Lymphocyten-Mikrocytotoxizitäts-Test (LMC)

Nach Kokultivationen von Lymphocyten mit Gliomzellen im Verhältnis 200 : 1 konnte kein Unterschied der Reaktivität gemischter Lymphocytenpopulationen und angereicherter T-Zellen festgestellt werden. Bei Kokultivationsraten von 30 bis 50 : 1 erwiesen sich T-Lymphocyten als reaktiver. B-Lymphocyten erreichten nur etwa 10 % der bei den T-Zellen gemessenen Reaktivität.

7.1.1. Tumorträger

Die lymphocytäre Reaktivität von Tieren mit subkutanen Transplantationstumoren der permanenten Linie 78FR-G-219T wurde während verschiedener Stadien des Tumorwachstums getestet. Lymphocyten aus der Milz, dem peripheren Blut, den Lymphknoten, dem Gliomgewebe und Thymocyten wurden 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Transplantation angereichert und im Verhältnis 200 : 1 mit Gliomzellen derselben Linie kokultiviert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 und der Abbildung 2 zusammengefaßt. Es zeigte sich, das Lymphocyten von Tumorträgern bereits 7 Tage nach der Transplantation von 20 x 10^6 Zellen

reaktiver waren als die vergleichsweise getesteten Lymphocyten von Kontrolltieren. Lymphocyten aus dem Gliomgewebe reagierten deutlich schwächer als die Lymphocyten aus den Organen und dem Blut. 14 Tage nach der Inokulation hatten sich bei 10,1 % der Tiere die Tumoren spontan soweit zurückgebildet, daß eine Anreicherung von Lymphocyten aus Gliomgewebe nicht möglich war. Die Reaktivität der Lymphocyten aus dem Blut und den Organen dieser Tiere war - gegenüber Tag 7 - um bis zu 10 % angestiegen. Bei den Tieren mit fortschreitendem Tumorwachstum war dagegen am Tag 14 die lymphocytäre Reaktivität stark vermindert, wobei Lymphocyten aus dem Thymus, den Lymphknoten und dem Gliomgewebe weniger reaktiv waren als Lymphocyten von Kontrolltieren und demzufolge im cytotoxischen Index negative Werte ergaben. 21 Tage nach der Transplantation war das subkutane Gliomgewebe zu einer Masse von 8g angewachsen. Die Reaktivität der Lymphocyten aus allen Lokalisationen war um bis zu einem Drittel geringer als die Reaktivität von Kontroll-Lymphocyten. Am Tag 28 war die lymphocytäre Reaktivität der Tumorträger noch weiter reduziert. Lymphocyten aus Gliomgewebe bewirkten ein beschleunigtes Gliomzellwachstum in vitro: 24 Stunden nach Beginn der Kokultivation wurden in den Testplatten etwa 20 % mehr lebende Gliomzellen gezählt als in Kontrollplatten, in denen unter gleichen Bedingungen Gliomzellen allein kultiviert worden waren. Lymphocyten von Tumorträgern der permanenten Linien 78FR-G-219 und 78FR-G-219C sowie 78FR-G-299 und 78FR-G-299T wurden 14 bis 21 Tage nach der Transplantation bei einer Tumormasse von 4 - 10 g präpariert und mit Gliomzellen kokultiviert. Die Reaktivität dieser Lymphocyten war in allen Untersuchungen geringer als die der Kontroll-Lymphocyten und ergab negative cytotoxische Indices.

Tabelle 2

Reaktivität von Lymphocyten aus Tumorträgern 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Transplantation von 78FR-G-219T - Zellen

Lymphocyten aus	Tumorgewicht in g				
		Regression	Progression		
	1,0	--	3,5	8,0	14,5
	Cytotoxischer Index				
Gliomgewebe	0,08	--	-0,16	-0,44	-0,84
Blut	0,19	0,26	0,05	-0,19	-0,22
Milz	0,28	0,42	0,08	-0,14	-0,30
Thymus	0,26	0,44	-0,12	-0,26	-0,35
Lymphknoten	0,20	0,36	-0,01	-0,20	-0,22
Tage nach der Transplantation	7	14		21	28

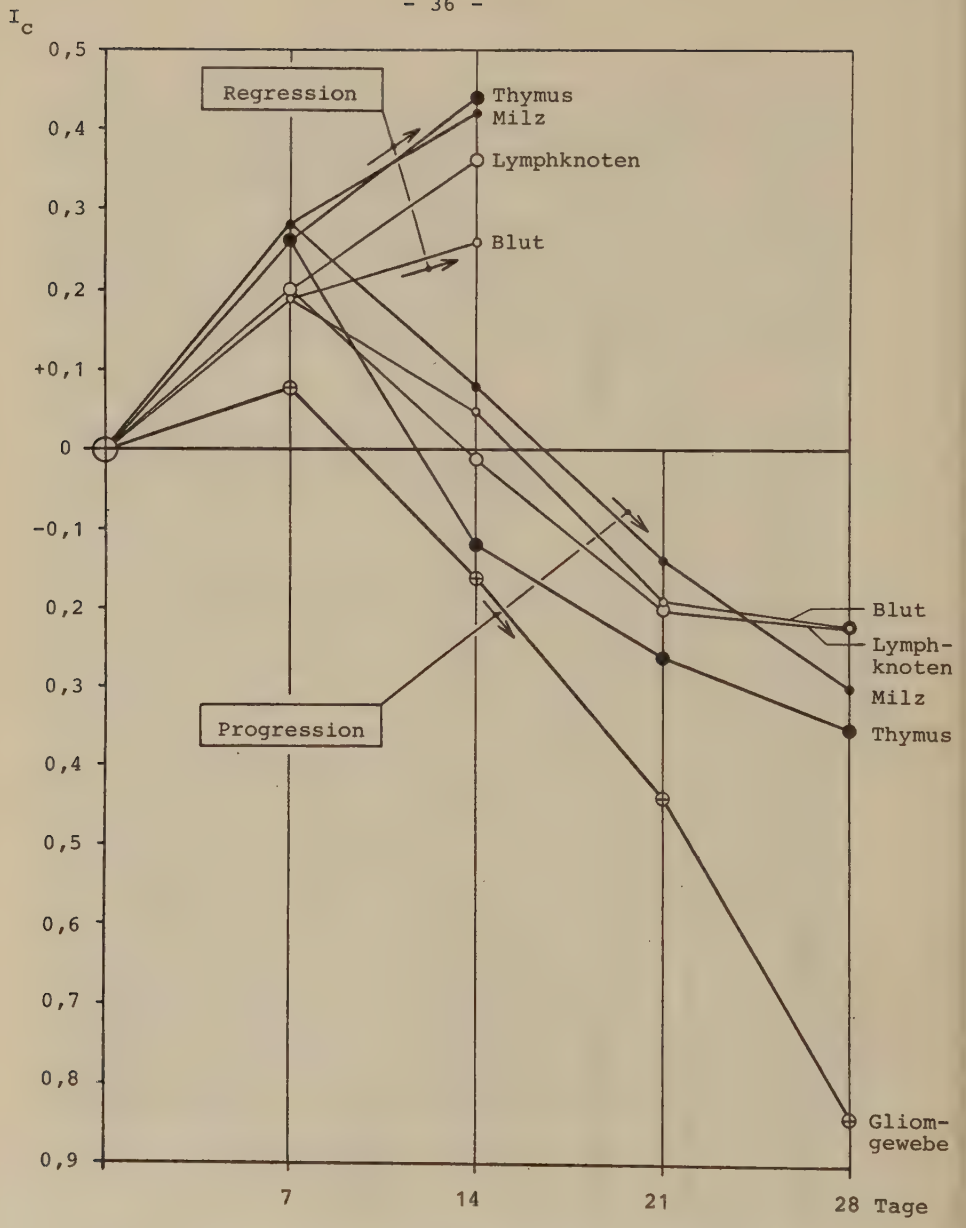

Abb. 2: Reaktivität von Lymphocyten aus Tumorträgern 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Transplantation von 78FR-G-219T - Zellen.

Lymphocyten von Tieren, bei denen es nach Transplantationen von 20 x 10^6 Zellen innerhalb von 14 Tagen zu keiner palpierbaren Gewebsreaktion an der Inokulationsstelle kam, erwiesen sich als besonders reaktiv gegenüber Gliomzellen. Ebenso wie bei den Lymphocyten von erfolgreich "gechallengten" Tieren errechneten sich im cytotoxischen Index Werte zwischen 0,55 und 0,65.

7.1.2. Immunisierte Tiere

Lymphocyten aus dem Blut, der Milz, den Lymphknoten und dem Thymus immunisierter Tiere wurden über einen Zeitraum von 2 bis 16 Wochen nach dem ersten Kontakt mit dem Antigen getestet (Tab. 3). Dabei wurden Lymphocyten entweder mit Gliomzellen der Linie, mit der die Tiere immunisiert worden waren, oder - um eine mögliche Kreuzreaktivität nachzuweisen - einer anderen permanenten Linie kokultiviert.

7.1.2.1. Immunisierungen mit DMS-modifizierten Gliomzellen

(Immunisierungslinien: 78FR-G-219 und 78FR-G-219T)
Tiere, die mit DMS-modifizierten Gliomzellen am 1., 8. und 15. Tag immunisiert worden waren (Gruppe I), zeigten einen Anstieg der lymphocytären Reaktivität erst nach der Boosterung mit nativen Gliomzellen. Die Reaktivität stieg bis auf einen Höchstwert von I_C 0,24 ($\pm$ 0,08) nach 8 Wochen, was einer Steigerung um etwa 15 % entspricht, und sank innerhalb des Beobachtungszeitraumes nur geringgradig ab. Eine zweite Gruppe von Tieren wurde wiederholt je einmal mit modifizierten Zellen immunisiert und mit nativen Zellen geboostert (Gruppe II). In 6 von 10 Fällen wuchsen nach der ersten Boosterung im Bereich der Inokulationsstelle Tumoren, davon 3 progressiv.

Tabelle 3

Reaktivität von Lymphocyten* 8 Wochen nach Abschluss verschiedener Immunisierungsverfahren mit Gliomzellen (78FR-G-219T) und Hirnzellen

Immunisierungsgruppe / Antigen	Passage	Immunisierte Tiere / tumorfreie Tiere	Cytotoxischer Index*
I / Gliomzellen + DMS	30 - 36	10 / 10	0,24
II / Gliomzellen + DMS	15 - 36	10 / 4	0,22
III / Gliomzellen + DMS + CFA	52 - 59	10 / 0	- 0,08**
IV / Gliomzellen + TNP	41 - 66	64 / 64	0,37
V / Gliomzellen + TNP	45 - 64	15 / 15	0,32
VI / Gliomzellen	2 - 6	20 / 20	0,21
VII / Hirnzellen + TNP	2 - 8	20 / 20	0,08

* aus Blut, Milz, Thymus, Lymphknoten, durchschnittlicher I_c

** Werte nach 4 Wochen

Die Tiere zeigten eine durchschnittliche Reaktivität von I_c 0,12 ($\pm$ 0,06). Nach der zweiten Boosterung der tumorfrei gebliebenen Tiere stiegen die Werte bis auf I_c 0,22 ($\pm$ 0,12) nach 8 Wochen. 10 weitere Tiere wurden am 1., 8. und 15. Tag mit DMS-modifizierten Zellen und einem Zusatz von komplettem FREUND'schen Adjuvanz (CFA) immunisiert und 2 Wochen später mit nativen Zellen geboostert (Gruppe III). Bei allen Tieren wuchsen an den Injektionsstellen z. T. progressiv wachsende Tumoren. 4 Wochen nach der Boosterung mußten die Tiere euthanasiert werden. Der cytotoxische Index für Lymphocyten aus dem Blut und den Organen lag nach 2 Wochen bei 0,05 ($\pm$ 0,04) und war nach 4 Wochen negativ.

7.1.2.2. Immunisierungen mit TNBS-modifizierten Gliomzellen

(Immunisierungslinien: 78FR-G-219T, 78FR-G-284, 78FR-G-344, 78FR-G-299T)
Nach der Immunisierung mit TNBS-modifizierten Gliomzellen am 1., 8. und 15. Tag wurden die Tiere entweder mit nativen (Gruppe IV) oder mit DMS-modifizierten Zellen (Gruppe V) geboostert. Bereits vor der Boosterung war die lymphocytäre Reaktivität der Tiere höher als die von Kontrolltieren. Die Indexwerte für die Linie 78FR-G-219T sind in Tabelle 4 und Abbildung 3 dargestellt. Die Reaktivität stieg bis zur 8. Woche nach der Boosterung um 22,9 % an und ging bis zur 12. Woche nur wenig zurück. Der I_c von Lymphocyten der mit DMS-modifizierten Zellen geboosterten Tiere lag zwischen 0,05 und 0,08 unter den Werten der mit nativen Zellen geboosterten Tiere. Lymphocyten von Tieren, die mit Zellen der Linie 78FR-G-219T immunisiert worden waren, reagierten gegenüber Zellen der Linien 78FR-G-284 und 78FR-G-344 cytotoxisch.

Tabelle 4

Reaktivität von Lymphocyten immunisierter Tiere 2, 4, 8 und 12 Wochen nach Abschluss der Immunisierung mit TNBS-modifizierten 78FR-G-219T - Zellen

Lymphocyten aus	Wochen			
	2	4	8	12
	Cytotoxischer Index			
Blut	0,15	0,22	0,30	0,28
Milz	0,21	0,33	0,43	0,36
Thymus	0,19	0,34	0,41	0,34
Lymphknoten	0,12	0,19	0,32	0,29

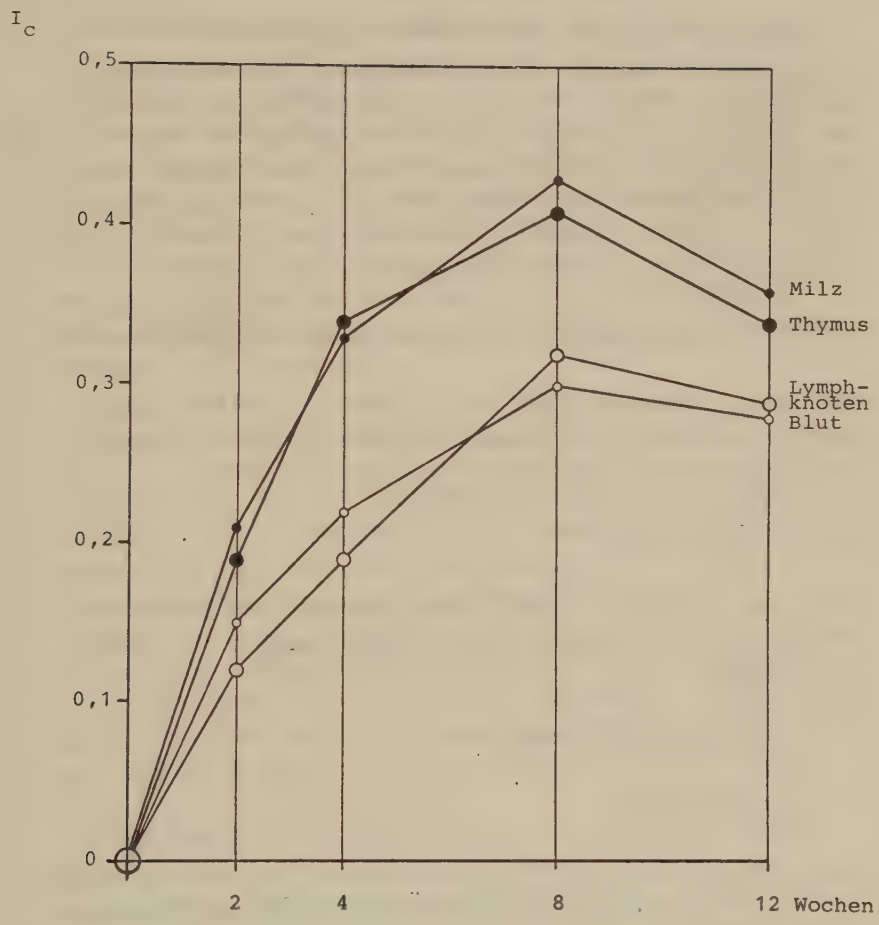

Abb. 3: Reaktivität von Lymphocyten immunisierter Tiere 2, 4, 8 und 12 Wochen nach Abschluß der Immunisierung mit TNBS-modifizierten Gliomzellen.

7.1.2.3. Immunisierung mit nativen Gliomzellen

(Immunisierungslinien: 78FR-G-219T und 78FR-G-299T)
Tiere, die mit nativen Zellen immunisiert und geboostert worden waren (Gruppe VI), zeigten ebenfalls einen Anstieg der lymphocytären Reaktivität bereits während des Immunisierungsverfahrens. Die Steigerungsrate blieb jedoch unter der der mit TNBS-modifizierten Zellen immunisierten Tiere zurück. Bis zur 8. Woche stieg die Reaktivität nur um 12,8 % und sank bis zur 12. Woche auf 8,6 %.

7.1.2.4. Immunisierung mit TNBS-modifizierten Hirnzellen

Die Immunisierung mit TNBS-modifizierten Hirnzellen (Gruppe VII) erzeugte einen Anstieg der Reaktivität der Lymphocyten gegenüber Gliomzellen um 3,7 % nach 8 Wochen.

7.1.2.5. Kontrollen

Gehirnzellen, die mit Lymphocyten immunisierter Tiere oder von Kontrolltieren kokultiviert wurden, zeigten ein ungestörtes Wachstum.

7.2. Colony-Inhibition-Test (CI)

7.2.1. Tumorträger

Lymphocyten wurden 14, 21 und 28 Tage nach der Transplantation von 20 x 10^6 Zellen der Linie 78FR-G-219T aus dem Gliomgewebe und den Organen der Tumorträger angereichert und auf ihre Fähigkeit, die Koloniebildung von Gliomzellen in vitro zu hemmen, untersucht. Dazu wurden die Lymphocyten im Verhältnis

4000 - 8000 : 1 mit Zellen der Linie 78FR-G-219T kokultiviert (Tab. 5 und 6). 14 Tage nach der Transplantation unterdrückten Tumorträger-Lymphocyten die Koloniebildung um durchschnittlich 19 %. Lymphocyten aus dem Gliomgewebe konnten das Koloniewachstum nicht unterdrücken; hier wuchsen in den Testflaschen sogar 4,6 % mehr Kolonien als in den Kontrollflaschen. Bis zum 21. Tag nach der Transplantation ging die Reaktivität der Lymphocyten aus den Organen um durchschnittlich 11,3 % zurück. Die Kokultivation von Gliomzellen mit Lymphocyten aus Gliomgewebe förderte das Koloniewachstum um 9,6 %. 28 Tage nach der Transplantation wurde die Koloniebildung durch Lymphocyten von Tumorträgern um bis zu 20 % verstärkt.

7.2.2. Immunisierte Tiere

2, 8 und 12 Wochen nach der Immunisierung mit TNBS-modifizierten Gliomzellen und nach der Boosterung mit nativen Zellen (Gruppe IV) wurden die Lymphocyten aus den Organen der Tiere angereichert und gegen Gliomzellen getestet.

Nach 2 Wochen wurde die Koloniebildung um durchschnittlich 8,5 %, nach 8 Wochen um bis zu 38 % und nach 12 Wochen noch um 34,3 % unterdrückt. Die Lymphocyten waren gegenüber Gliomzellen aller permanenten Linien in gleicher Weise reaktiv.

7.3. Zellvermittelte Cytolyse - Ultrastrukturelle Befunde

Bei der elektronenmikroskopischen Darstellung liegen Lymphocyten und Gliomzellen in unterschiedlichen Abständen nebeneinander. Im Cytoplasmasaum der Lymphocyten sind neben freien Ribosomen vermehrt Mitochondrien erkennbar. Der Anteil an Euchromatin scheint erhöht zu sein.

Tabelle 5

Hemmung der Koloniebildung ("Colony Inhibition") durch Lymphocyten von Tumorträgern und Kontrolltieren 14 Tage nach der Transplantation mit 78FR-G-219T - Zellen

Lymphocyten aus	Anzahl der Kolonien (± Standardabweichung)		"Colony Inhibition" in %
	Tumorträger	Kontrolltiere	
Gliomgewebe	232,0 (± 15,1)	237,0 (± 17,7)*	- 4,6
Blut	211,5 (± 17,8)	255,2 (± 7,4)	17,2
Milz	171,3 (± 19,2)	221,0 (± 23,2)	22,5
Thymus	184,8 (± 34,3)	225,7 (± 31,3)	18,1
Lymphknoten	205,1 (± 21,4)	246,1 (± 16,7)	17,7

* durchschnittliche "Colony Inhibition" aller Kontroll-Lymphocyten

Tabelle 6

Hemmung der Koloniebildung ("Colony Inhibition") durch Lymphocyten von Tumorträgern und Kontrolltieren 21 Tage nach der Transplantation mit 78FR-G-219T - Zellen

Lymphocyten aus	Anzahl der Kolonien (± Standardabweichung)		"Colony Inhibition" in %
	Tumorträger	Kontrolltiere	
Gliomgewebe	263,9 (± 22,5)	237,0 (± 17,7)*	- 9,6
Blut	234,0 (± 18,6)	255,2 (± 7,4)	8,3
Milz	198,2 (± 12,1)	221,0 (± 23,2)	10,3
Thymus	218,4 (± 18,7)	225,7 (± 31,3)	13,2
Lymphknoten	224,7 (± 29,8)	246,1 (± 16,7)	8,7

* durchschnittliche "Colony Inhibition" aller Kontroll-Lymphocyten

Die Gliomzellen sind reich an Cytoplasma mit zahlreichen Organellen wie Mitochondrien vom Crista-Typ, rauhem teilweise erweiterten endoplasmatischen Retikulum, gut ausgebildeten Golgi-Feldern und Vakuolen mit unterschiedlich elektronendichtem, nicht näher definierbaren Material. Der große unregelmäßig geformte Kern weist in einem überwiegend hellen und lockeren Chromatingerüst einen deutlichen Nukleolus auf. Marginal ist wenig Heterochromatin angeordnet.
Membrankontakte bestehen sowohl zwischen den Lymphocyten untereinander als auch zwischen Gliomzellen und Lymphocyten. In einigen Fällen sind Lymphocyten rosettenartig um Gliomzellen gruppiert (Abb. 4), wobei die Lymphocyten den Gliomzellen entweder breitflächig oder mit fingerförmigen Cytoplasmafortsätzen mehr oder weniger dicht angelagert sind. Bei solchen Gliomzellen finden sich Anzeichen der Lysis wie Verlust der Kern- und Cytoplasmastruktur, Schwellung bzw. Auflösung von Mitochondrien sowie multiple Membrandefekte. Letztere sind insbesondere in den Kontaktzonen zwischen Lymphocyten und Gliomzellen erkennbar. Dabei scheinen einzelne Gliomzellmembran - Bruchstücke an der Oberfläche der Lymphocyten zu haften (Abb. 4).

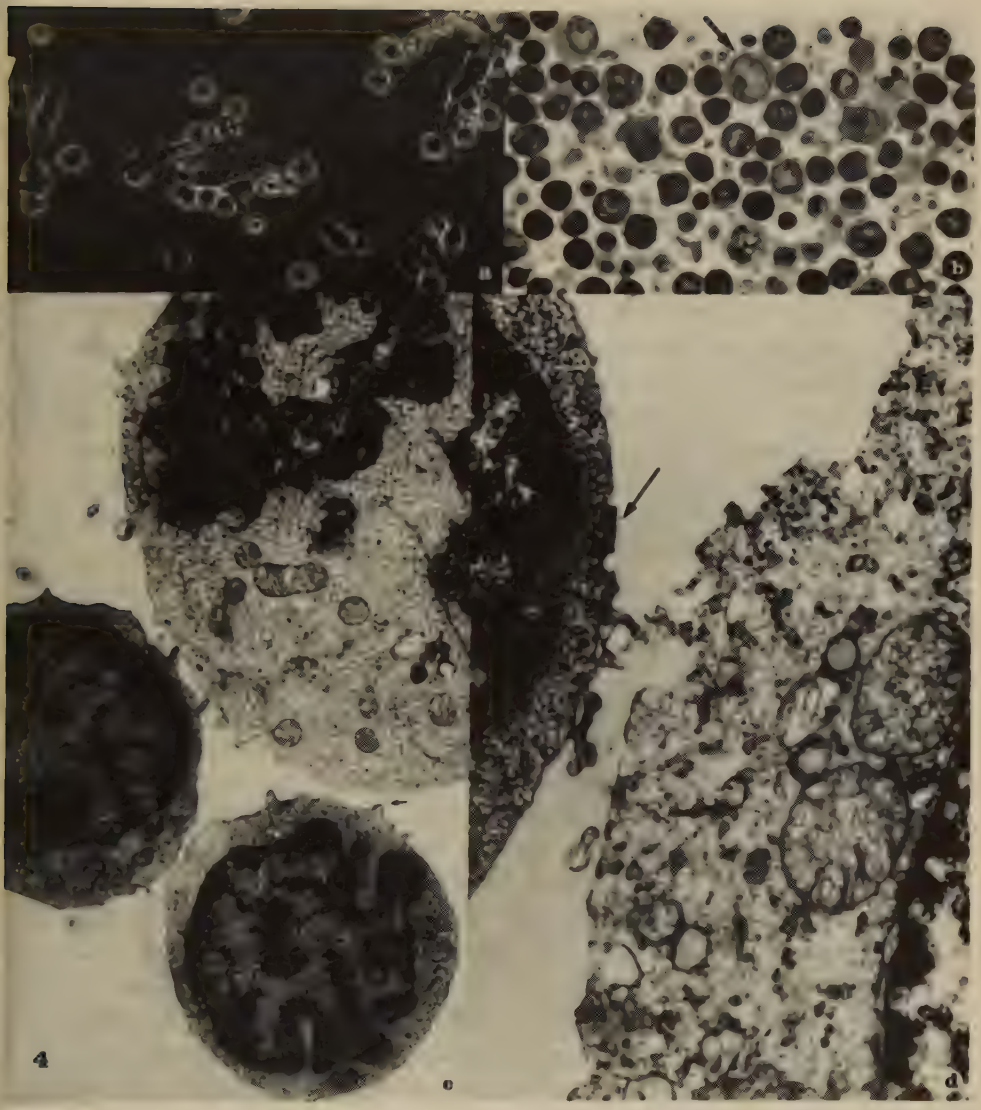

Abb. 4: Reaktionen von Lymphocyten gegen Gliomzellen in vitro.
Anlagerung von Lymphocyten an Gliomzellen (a-c) mit breitflächiger Membranberührung (b →) oder Verbindungen über Cytoplasmafortsätze (c), sowie Gliomzellmembran-Bruchstücke an der Oberfläche von Lymphocyten (c, d →; a: Phasenkontrast x400; b: Semidünnschnitt, Toluidinblau-Fbg. x960; c, d: Elektronenmikroskopische Aufnahmen x8000 bzw. x21000).

DISKUSSION

Aufgrund der morphologischen Befunde und des Nachweises gliaspezifischer Markerproteine kann davon ausgegangen werden, daß die diesen Untersuchungen zugrundeliegenden Tumoren glialen Ursprungs sind. Sowohl bei den permanenten Linien aus den Primärtumoren als auch bei den aus Transplantationstumoren und Zellklonen gezüchteten Linien blieb die Fähigkeit der Zellen, diese spezifischen Proteine zu bilden, selbst nach zweijähriger Kultivationszeit erhalten. Damit ist der gliale und bei einigen Linien astrocytäre Charakter des Tumormaterials in Übereinstimmung mit Befunden anderer Autoren (BENDA et al., 1971; STAVROU et al., 1971; WECHSLER et al., 1972) hinreichend gewährleistet.

Die Abnahme der Tumorogenität der permanenten Kulturen von der 30. in-vitro-Passage an steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer Veränderung der Antigenität der Zellen in vitro. Für dieses bisher ungeklärte Verhalten bieten sich verschiedene Erklärungen an. In Frage kommen die Inkorporation von Stoffen mit Antigencharakter aus dem Kultivationsmedium (z. B. Serumproteine) ebenso wie andere kultivationsbedingte Veränderungen der Zellmembran, die als neue, nicht tumorassoziierte Antigene imponieren könnten. Interessanterweise gehen Veränderungen der Tumorogenität in der Regel einher mit histologisch erfaßbaren Veränderungen der Zellmorphologie. Meist konnten durch eine in-vitro/in-vivo-Wechselpassage die ursprüngliche Morphologie und auch die tumorogenen Eigenschaften wiederhergestellt werden.

Die von anderen Untersuchern beschriebene Schwierigkeit, aus experimentellen Gliomen Tumorgewebe direkt, d.h. ohne in-vitro-Kultivation, erfolgreich intracerebral oder subkutan zu übertragen (BENDA et al., 1968; FIELDS et al. 1975), ergab sich nicht.

Die Befunde hinsichtlich der Latenzzeit bis zum Auftreten zentralnervöser Störungen bzw. einem sichtbaren Tumorwachstum und der cystischen und infiltrativen Eigenschaften der subkutanen Tumoren decken sich mit den von CRAVIOTO (1978) beschriebenen. Während dort jedoch in über 1000 Fällen keine Metastasierung registriert werden konnte (CRAVIOTO, 1978), wurden bei Tumoren der Linie 78FR-G-219 Metastasen in den regionären Lymphknoten und in der Lunge nachgewiesen. Dazu ist zu bemerken, daß sich Metastasen ausschließlich von über 14 g schweren subkutanen cystisch veränderten und infiltrativ wachsenden Tumoren absiedelten. In Bezug auf die immunologische Gesamtlage des Organismus dürfte subkutanes Gliomwachstum - zumindest in Spätstadien - intracerebralem Gliomwachstum nur bedingt vergleichbar sein. Wegen der methodischen Schwierigkeiten, den Ablauf intracerebralen Tumorwachstums in vivo zu verfolgen und Lymphocyten aus solchem Gewebe zu isolieren, wurden die Untersuchungen nur an Tieren mit subkutanen Transplantationstumoren durchgeführt. Unter diesem Vorbehalt müssen die bei den Tumorträgern erhobenen Befunde interpretiert werden.

Bei der Prüfung der Reaktivität von Lymphocyten während verschiedener Stadien des Tumorwachstums ergaben sich weitgehende Übereinstimmungen der in vitro und in vivo erhobenen Befunde. Nach der Übertragung eines ausreichend großen Transplantats entwickelten sich bereits innehalb einer Woche sowohl palpier-

bare Tumoren als auch eine in vitro meßbare Immunantwort. Bereits RIDLEY u. CAVANAGH (1971) und LEVY et al. (1972) berichteten von Tumoren des Zentralnervensystems, die eine zellvermittelte Immunantwort induzieren konnten. Während die lymphocytäre Reaktivität bei spontaner Tumorrückbildung weiter anstieg, waren Organlymphocyten von Tieren mit fortschreitendem Tumorwachstum weniger cytotoxisch als Kontroll-Lymphocyten. Lymphocyten aus Gliomgewebe zeigten praktisch in keiner Phase wirksame cytotoxische Eigenschaften. Dagegen bewirkten sie ab einem bestimmten Wachstumsstadium des Tumors ein in-vitro-"Enhancement" bei den Gliomzellen.

Die Beobachtung, daß gemischte Lymphocytenpopulationen und angereicherte T-Zellen die gleichen reaktiven bzw. immundefizienten Eigenschaften aufwiesen, erklärt sich damit, daß bei der Kokultivationsrate von 200 : 1 auch in den gemischten Lymphocytenpopulationen genügend T-Zellen vorhanden waren, um die beschriebenen Effekte zu erzielen. Die Beteiligung von B-Lymphocyten an cytotoxischen Reaktionen im LMC wurde ausgeschlossen. Nicht untersucht wurde der Einfluß der in den angereicherten Lymphocytenkulturen noch vorhandenen 1 bis 2 % Makrophagen. Der allmähliche Verlust der zellulären Reaktivität bei fortschreitendem Gehirntumorwachstum wird von den meisten Untersuchern im Zusammenhang mit einer allgemein reduzierten Immunabwehr gesehen (BROOKS et al., 1972, 1974; MAHALEY et al., 1977). Die weitgehende Reaktionslosigkeit gliominfiltrierender Lymphocyten und der - nach anfänglicher Steigerung - vergleichsweise starke Abfall der Reaktivität der Thymocyten stimmen mit der Beobachtung überein, daß fortschreitendes Tumorwachstum häufig von Suppressor-T-Zellen begleitet wird (KIRCHNER, 1978). VOSE et al. (1977) und VOSE u. MOORE (1979) sehen in den tumorinfil-

trierenden Lymphocyten eine "reiche Quelle von Suppressor-Zellen". ROSZMAN u. BROOKS (1980) demonstrierten "qualitative Veränderungen" bei T-Lymphocyten von Gehirntumorpatienten. Die Stimulation des in-vitro-Wachstums von Gliomzellen bei der Kokultivation mit Lymphocyten aus Gliomgewebe und die gezeigten engen Verbindungen zwischen Lymphocyten und Gliomzellen (Abb. 4) lassen vermuten, daß direkte Wechselwirkungen zwischen diesen Zellen bestehen. Diese Beobachtungen können einem Komplex verschiedenster Interaktionen immunkompetenter Zellen untereinander und zwischen immunkompetenten Zellen und Tumorzellen während der Tumor/Wirt - Auseinandersetzung zugeordnet werden (MIKULSKI u. MUGGIA, 1978). Bei den Wechselwirkungen zwischen B- und T-Zellen können die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen und die Produktion humoraler Antikörper durch T-Zellen sowohl unterdrückt als auch gefördert werden (BENACERRAF et al., 1975). Makrophagen können einerseits - durch vermittelnde T-Zellen - cytotoxische Eigenschaften entwickeln (MORANTZ et al., 1979), andererseits die lymphocytäre Reaktivität fördern oder hemmen (KIRCHNER et al., 1975). Wenig ist noch über die Beeinflussung von T-Zellen oder B-Zellen untereinander bekannt (KATZ u. AMERDING, 1976).

Möglicherweise ist das Phänomen der Immunsuppression bei progressivem Hirntumorwachstum Ausdruck einer Umorientierung der vielen genau aufeinander abgestimmten Regulationsmeachanismen innerhalb des Immunsystems. Die T-Lymphocyten spielen dabei eine zentrale Rolle, weil sie offenbar in der Lage sind, gegen den Tumor gerichtete humorale und zelluläre Abwehrmaßnahmen zu unterbinden (BENACERRAF et al., 1975; KIRCHNER, 1978). Dieses Verhalten könnte sich aus der Tatsache erklären, daß bei der von REVOLTELLA et al. (1979) beschriebenen spontanen

Fusion zwischen Lymphocyten und Tumor (Neuroblastom)-Zellen Zellhybriden entstehen, also ein Austausch genetischen Materials stattfindet. Dadurch könnten entweder lymphocytäre und tumorassoziierte Antigene nebeneinander oder neue, Tumorzellen und Lymphocyten gemeinsame, Antigene exprimiert werden. Demnach müßten T-Lymphocyten eine natürliche Selbst-Toleranz (NACHTIGAL et al., 1975) auf die tumorassoziierten Antigene ausdehnen, um humorale und zelluläre "Auto"-Immunreaktionen zu verhindern.

Die Entwicklung einer Immundefizienz durch eine zahlenmäßige Verminderung von T-Lymphocyten, wie sie BROOKS et al. (1976, 1977) bei Patienten mit Hirntumoren nachwiesen, könnte ebenfalls damit in Zusammenhang gebracht werden. Interessant ist die Beobachtung von GRAVES u. BROWN (1974), daß Hirnzellen und Thymocyten gewisse gemeinsame Merkmale der Oberflächenmembran aufweisen.

Für den Nachweis und die Charakterisierung tumorassoziierter Antigene kommt der in-vivo-Immunisierung im syngenen System besondere Bedeutung zu, da Reaktionen gegen andere, als Antigene imponierende Merkmale weitgehendst ausgeschlossen sind (HERBERMANN, 1977). Chemisch induzierte Tumoren bilden mit wenigen Ausnahmen individuelle, nicht kreuzreagierende Antigene (HERBERMANN, 1977). Zwar wurden solche Antigene chemisch induzierter neurogener Tumoren mehrfach nachgewiesen (STEELE u. SJÖGREN, 1974; HELLSTRÖM et al., 1978), schienen aber für die Abwehrfunktion keine entscheidende Rolle zu spielen (HELLSTRÖM u. BROWN, 1980). Die Hauptschwierigkeiten bei dem Versuch, diese schwachen Antigene zu verstärken, sind die Art und Weise der Modifikation, die Applikationsart und schließlich

die Antigendosis(SPENCE et al., 1979; HERBERMANN, 1977). Wird die Antigendosis zu gering gewählt, entsteht keine wirksame Reaktion des Immunsystems (SPENCE et al., 1979), wird eine zu hohe Antigendosis verabreicht, besteht die Gefahr des "Enhancements" (WARNATZ, 1975). Die chemische Modifikation mit DMS oder TNBS führte zu einer deutlichen, wenn auch unterschiedlichen Steigerung der Antigenität der behandelten Zellen (Tab. 3).

Die besten Ergebnisse hinsichtlich der Belastbarkeit der Gliomimmunität und der Induktion lymphocytotoxischer Reaktionen in vitro ergab die Immunisierung mit TNBS-modifizierten Zellen in einer Dosis knapp unter der zur Tumorerzeugung erforderlichen Mindestzellzahl und einer anschließenden Boosterung mit 1 - 10 x 10^6 nativen Gliomzellen. Die Effektivität der TNBS-Modifikation erwies sich bei zahlreichen Untersuchungen (BURAKOFF et al.,1976; GALILI et al., 1976; LEMMONNIER et al., 1977; SHEARER et al., 1976; STAVROU et al., 1980). Nach der Immunisierung mit DMS-modifizierten Zellen, insbesondere beim Zusatz von CFA, trat Tumorwachstum an den Inokulationsstellen auf. Die zelluläre Immunreaktion wurde bei diesem Verfahren kaum gesteigert (Tab. 3), wobei möglicherweise die bereits diskutierten immunsuppressiven Vorgänge eine Rolle gespielt haben. Auch SPENCE et al. (1979) erzielten bei Immunisierungsverfahren mit Zellen chemisch induzierter neurogener Tumoren unter Zusatz von CFA keine Antigenitätssteigerung.

Obwohl die Reaktionsmechanismen von DMS und TNBS mit Zellproteinen hinreichend bekannt sind (STAAB u. ANDERER, 1976; PRAGER u. BAECHTEL, 1973), bleibt der genaue Mechanismus der Beeinflussung weiterhin unklar. Dieser dürfte jedoch als Fol-

ge der Bildung eines Hapten-Carrier-Komplexes an der Zelloberfläche, die unter anderem zu einer Erhöhung der Antigenität des Carrier-Proteins führt, zu verstehen sein. Da dabei auch zelleigene, nicht tumorassoziierte Antigene modifiziert werden können (SHEARER, 1974), ist für die Beurteilung der Spezifität der zellulären Antikörperwirkung die Kontrolle durch in gleicher Weise modifizierte syngene Hirnzellen unbedingt notwendig. Die Ergebnisse zeigen, daß Lymphocyten nach der Immunisierung mit TNBS-modifizierten Hirnzellen nur schwach reagieren (Tab. 3).

Zu den nachgewiesenen Kreuzreaktionen muß festgestellt werden, daß sie zwischen Zellinien aus morphologisch und immuncytochemisch nahe verwandten Gliomen auftraten. Die gleichmäßige Hemmung der Koloniebildung bei allen untersuchten Linien durch Lymphocyten nach Immunisierung mit einer Linie läßt sich möglicherweise auf eine in-vitro-Stimulation der Reaktivität zurückführen, die während der Kultivation über mehrere Tage wirksam werden konnte.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch systemische perorale Gaben von Methylnitrosoharnstoff (MNH) an 6 Monate alte Fischer-Inzuchtratten (F 344) wurden Hirntumoren induziert. Aus vier der in vitro explantierten und erfolgreich gezüchteten Tumoren konnten folgende permanente Gliomzellinien etabliert werden: 78FR-G-219 (pleomorphes Gliom), 78FR-G-299 (Astrocytom I-II) sowie 78FR-G-284 und 78FR-G-344 (Mischgliom II), außerdem durch Klonieren und aus Transplantationstumoren die permanenten Linien 78FR-G-219C und 78FR-G-219T bzw. 78FR-G-299T. Alle diese Zellinien produzierten die gliaspezifischen Proteine S-100 und GFAP und waren sowohl bei intracerebraler als auch bei subkutaner Inokulation tumorogen.

Um Entwicklung und Ablauf zellulärer Immunreaktionen gegen gliomassoziierte Antigene sowohl während des Gliomwachstums als auch nach Immunisierungen mit syngenen Gliomzellen zu verfolgen, wurde die Reaktivität von Lymphocyten aus Gliomgewebe, Blut, Milz, Thymus und Lymphknoten syngener Ratten in vitro getestet und zu den in vivo erhobenen Befunden in Beziehung gesetzt.

Bei Tumorträgern stieg zunächst die lymphocytäre Reaktivität in vitro an und erreichte die höchsten Werte bei spontaner Rückbildung des Tumors. Bei fortschreitendem Tumorwachstum zeigten die in-vitro-Tests eine allmähliche Suppression lymphocytärer Reaktivität an. Gliominfiltrierende Lymphocyten reagierten kaum cytotoxisch und förderten ab einer bestimmten Tumorgröße das Wachstum von Gliomzellen in vitro.

Die Antigenität der gezüchteten Gliomzellen wurde in verschiedenen Passagen sowohl im nativen Zustand als auch nach

chemischer Modifikation vergleichend untersucht. Unmittelbar nach der Modifikation der Zellen mit Dimethylsulfat (DMS) bzw. Trinitrophenylsulfonsäure (TNBS) wurden die konjugierten Zellen zur Immunisierung syngener Tiere verwendet. Die chemische Modifikation der Zellen sowohl mit DMS als auch mit TNBS führte zu einer Erhöhung ihrer Antigenität. Die deutlichste Steigerung der Produktion zellulärer gliomcytotoxischer Antikörper war nach der Immunisierung mit TNBS-modifizierten Zellen zu beobachten. Die nach der Immunisierung mit TNBS-modifizierten Gliomzellen der Linien 78FR-G-219T, 78FR-G-284 und 78FR-G-344 isolierten Lymphocyten zeigten eine deutliche Kreuzreaktivität. Nach der Immunisierung waren Lymphocyten gegenüber kultivierten normalen Hirnzellen nicht cytotoxisch. Die Immunisierung mit TNBS-modifizierten Hirnzellen führte zu geringgradigen cytotoxischen Reaktionen gegenüber Gliomzellen und Hirnzellen.
Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß
a) die zellulären Immunreaktionen während fortschreitendem Gliomwachstum stark beeinträchtigt sein können,
b) aus Gliomgewebe isolierte Lymphocyten kaum cytotoxische Eigenschaften haben, dagegen das Wachstum von in vitro etablierten Gliomzellen begünstigen können, und
c) die Antigenität von Gliomzellen durch die TNBS-Konjugation deutlich gesteigert werden kann. Somit stellt die Haptenisierung gliomassoziierter Antigene eine Möglichkeit dar, die Gliom/Wirt - Wechselbeziehungen näher zu definieren.

SUMMARY

Brain tumors were induced in six-month old inbred Fischer rats (F 344) by systemic application of methylnitrosurea (MNH). Four of them were established in culture and propagated as 78FR-G-219 (pleomorphic glioma), 78FR-G-299 (astrocytoma I-II), 78FR-G-284 and 78FR-G-344 (mixed gliomas) permanent lines. All cell lines produced S-100 and GFA-protein and grew as tumors when inoculated sc or ic in syngeneic hosts.

The study was performed to investigate the development and the time course of lymphocyte-mediated reactivity in glioma-bearing and glioma-immunized syngeneic animals. Cytotoxic and inhibiting responses of tumor-infiltrating, blood, spleen, thymus and lymph node lymphocytes have been compared.

Glioma-bearing animals showed a remarquable in vitro lymphocyte-mediated cytotoxicity in the initial stage of glioma growth. Reactivity had a further increase in glioma regressing rats. In coincidence with a progressively growing glioma the in vitro reactivity changed over to a general decrease nearly down to the lack of reactivity and - in some cases - to a target cell "enhancement". Another major observation was the reduced responsiveness of glioma-associated lymphocytes in comparison to blood, spleen, thymus and lymph node lymphocytes.

Animals were immunized with native cells and cells conjugated with Dimethylsulphate(DMS) and Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS). The best results were obtained with TNBS-treated cells and amounted to an increase of the cytotoxicity index. Lymphocytes cross-reacted with cells of the

pleomorphic glioma line and the mixed glioma lines. Lymphocytes from immunized and control rats were not cytotoxic for normal brain cells. After immunization with TNBS-treated brain cells lymphocytes were slightly cytotoxic for normal brain cells and glioma cells as well.
The results of the present study show that
a) glioma-bearing animals have a broad suppression of cell-mediated immunocompetence in the progressive stage of tumor growth,
b) glioma-infiltrating lymphocytes are not cytotoxic for glioma cells in vitro and - furthermore - may cause a target cell "enhancement", and
c) the antigenicity of glioma cells can be definitely raised with TNBS-treatment. It would seem that haptenization of glioma-associated antigens may be a promising approach to the study of glioma/host - interactions.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sta (34/2)), der C. Bohnewand-Fonds für Krebsforschung und der Münchner Universitätsgesellschaft e.V. durchgeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

ASHWOOD-SMITH, M.J.:
Preservation of mouse bone marrow at -79°C
with dimethylsulphoxide.
Nature 190, 1204 (1961)

BAKER, P., WEISER, R.S., JUTILA, J., EVANS, C.A.
BLANDAU, R.J.:
Mechanisms of tumor homograft rejection: The behavior
of Sarcoma I ascites tumor in the A/Jax and C57BL/6K
mouse.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 101, 46 (1962)

BALDWIN, R.W., PRICE, M.R.:
Nature and expression of tumour antigens associated
with experimental animal and human tumours.
Ann. clin. Biochim. 13, 488 (1976)

BENACERRAF, B., KAPP, J.A., DEBRÉ, P., PIERCE, C.W.,
CROIX, F. de la:
The stimulation of specific suppressor T-cells in genetic
non-responder mice by linear random copolymers of L-amini
acids.
Transplant. Rev. 26, 21 (1975)

BENDA, P., LIGHTBODY, J. SATO, G., LEVINE, L., SWEET, W.H.:
A differentiated rat glial cell strain in tissue culture.
Science 161, 370 (1968)

BENDA, P., SOMEDA, K., MESSER, J., SWEET, W.H.:
Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture.
J. Neurosurg. 34, 310 (1971)

BERTRAND, I., MANNEN, H.:
Étude des réactions vasculaires dans les astrocytomes.
Rév. neurol. 102, 3 (1960)

BILLINGHAM, R.E., BRENT, L., MEDAWAR, P.B.:
Qualitative studies on tissue transplantation immunity. II. The origin, strength and duration of activity and adoptively acquired immunity.
Proc. Roy. Soc. S. B. 143, 58 (1954)

BØYUM, A.:
Seperation of white blood cells.
Nat. 204, 793 (1964)

BØYUM, A.:
Seperation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, 97 (1968)

BØYUM, A.:
Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages.
Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5 (1976)

BROOKS, W.H., NETSKY, M.G., NORMANSELL, D.E., HORWITZ, D.A.:
Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intra-cranial tumors.
J. exp. Med. 136, 1631 (1972)

BROOKS, W.H., CALDWELL, H.D., MORTARA, R.H.:
Immune responses in patients with gliomas.
Surg. Neurol. 2, 419 (1974)

BROOKS, W.H. ROSZMAN, T.L., ROGERS, A.S.:
Impairment of rosette-forming T-Lymphocytes in patients with primary brain tumors.
Cancer 37, 1860 (1976)

BROOKS, W.H., ROSZMAN, T.L., MAHALEY, M.S., WOOSLEY, R.E.:
Immunobiology of primary intracranial tumors.
II. Analysis of lymphocyte subpopulations in patients with primary brain tumors.
Clin. exp. Immunol. 29, 61 (1977)

BURAKOFF, S.J., GERMAIN, R.N., BENACERRAF, B.:
Cross-reactive lysis of trinitrophenyl (TNP)-derivatized H-2 incompatible target cells by cytolytic T-lymphocytes generated against syngeneic TNP spleen cells.
J. Exp. Med. 144, 1609 (1976)

BURAKOFF, S.J., GERMAIN, R.N., DORF, M.E., BENACERRAF, B.:
Inhibition of cell-mediated cytolysis of trinitrophenyl-derivatized target cells by alloantisera directed to the products of the K and D loci of the H-2 complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 625 (1976)

COONS, A.H.:
The application of fluorescent antibodies to the study of naturally occuring antibodies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 658 (1957)

CORNAIN, S., CARNAUD, C., SILVERMAN, D., KLEIN, E., RAJEWSKY, M.F.:
Spleen cell reactivity against transplanted neurogenic rat tumors induced by ethylnitrosourea: Uncovering of tumor specifity after removal of complement-receptor-bearing lymphocytes.
Int. J. Cancer 16, 301 (1975)

CRAVIOTO, H.:
Immunology of experimental brain tumors.
The Handbook of Cancer Immunology
Ed.: H. Waters, Garland STPM Press New York, London 1978

DAY, E.D., BIGNER, D.D.:
Specificity, cross-reactivity and affinity of ^{125}I-labeled antiglioma antibodies for monolayers of cultured glioma cells.
Cancer Res. 33, 2362 (1973)

DOUGHERTY, R.M.:
Use of dimethylsulphoxide for preservation of tissue culture cells by freezing.
Nature 193, 550 (1962)

DRUCKREY, H., IVANKOVIC, C., PREUSSMANN, R.:
Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-N-nitrosoharnstoff.
Z. Krebsforsch. 66, 389 (1965)

FIELDS, K.L., GOSLING, C., MEGSON, M., STERN, P.L.:
New cell surface antigens in rats defined by tumors of the nervous system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1296 (1975)

GALILI, N., NAOR, D., ASJÖ, B., KLEIN, G.:
Induction of immune responsiveness in a genetically low-responsive tumor-host combination by chemical modification of the immunogen.
Eur. J. Immunol. 6, 473 (1976)

GAMBETTI, P., ERULKAR, S.E., SOMLYO, A.P., GONATAS, N.K.:
Calcium-containing structures in vertebrate glial cells. Ultrastructural and microprobe analysis.
J. Cell Biol.64, 322 (1975)

GRAVES, M.F., BROWN, G.:
Antigenic correlation between brain and thymus.
Lancet, i, 455 (1974)

GRIMM, E., PRICE, Z., BONAVIDA, B.:
Studies on the induction and expression of T-cell-mediated immunity. VIII. Effektor-target junctions and target cell membrane disruption during cytolysis.
Cell. Immunol. 46, 77 (1979)

HAYFLICK, L.U., MOORHEAD, P.S.:
Serial cultivation of human diploid cell strains.
Exp. Cell. Res. 25, 585 (1961)

HELLSTRÖM, I.:
A colony inhibition technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cells in vitro.
Int. J. Cancer 2, 65 (1967)

HELLSTRÖM, I., HELLSTRÖM, K.E.:
Studies on cellular immunity and its serum-mediated inhibition in Moloney-virus-induced mouse sarcomas.
Int. J. Cancer 4, 587 (1969)

HELLSTRÖM, I., HELLSTRÖM, K.E.:
Colony inhibition and cytotoxic assays.
In Vitro Methods of Cell-Mediated Immunity.
Eds.: B.R. Bloom and P.R. Glade, N.Y. Academic Press,
409 (1971)

HELLSTRÖM, I., HELLSTRÖM, K.E., SJÖGREN, H.O., WARNER, G.A.:
Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms
of various histological types.
Int. J. Cancer 7, 1 (1971)

HELLSTRÖM, K.E., HELLSTRÖM, I., BROWN, J.P.:
Unique and common tumor-specific transplantation antigens
of chemically-induced mouse sarcomas.
Int. J. Cancer 21, 317 (1978)

HELLSTRÖM, K.E., BROWN, J.P.:
Tumor Antigens.
The Antigens, Vol. 5, 1
Ed.: M. SELA. New York, Academic Press (1979)

HERBERMAN, R.B.:
Immunogenicity of tumor antigens.
Biochim. Biophys. Acta 473, 93 (1977)

HOLDEN, H.T., HASKILL, J.S., KIRCHNER, H., HERBERMAN, R.B.:
Two functionally distinct anti-tumor effector cells isolated
from primary murine sarcoma virus-induced tumors.
J. Immunol. 117, 440 (1976)

IVANKOVIC, S.:
Selektive Erzeugung von Geschwülsten im Gehirn und Nerven-
system.
Ed.: H.E. Bock; Krebsforschung und Krebsbekämpfung Bd. VI,
97. München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1967

JÄNISCH, W., SCHREIBER, D,:
Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystems.
Jena Fischer (1969)

JÄNISCH, W., SCHREIBER, D., WARZOK, R., OSSKE, G.:
Frühstadien von Geschwülsten des Zentralnervensystems.
Experimentell-morphologische Untersuchung.
Exp. Path. 4, 60 (1970)

KATZ, D.J., AMERDING, D.:
The role of histocompatibility gene products in lymphocyte tiggering and differentiation.
Fed. Proc. 35, 2053 (1976)

KERSTING, G.:
Die Gewebszüchtung menschlicher Hirngeschwülste.
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1961

KLEIHUES, P., LANTOS, P.L., MAGEE, P.N.:
Chemical carcinogenesis in the nervous system.
Int. Rev. Exp. Pathol. 15, 153 (1976)

KLEIN, E.:
Hypersensitivity reactions at tumor sites.
Cancer Res. 29, 2351 (1969)

KLEIN, G., SJÖGREN, H.O., KLEIN, E., HELLSTRÖM, K.E.:
Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host.
Cancer Res. 20, 1561 (1960)

KIRCHNER, H., HOLDEN, H.T., HERBERMAN, R.B.:
Splenic suppressor macrophages induced in mice by injektion of Corynebacterium parvum.
J. Immunol. 115, 1212 (1975)

KIRCHNER, H.:
Suppressor cells of immune reactivity in malignancy.
Europ. J. Cancer 14, 453 (1978)

KORNBLITH, P.L., DOHAN, F.C., Jr., WOOD, W.C., WHITMAN, B.O.:
Human astrocytoma: Serum-mediated immunologic response.
Cancer 33, 1512 (1974)

KUMAR, S. TAYLOR, G.:
Specific lymphotoxicity and blocking factors in tumors
of the central nervous system.
Brit. J. Cancer 28, I, 135 (1973)

LEMONNIER, F., BURAKOFF, S.J., GERMAIN, R.N., BENACERRAF, B.:
Cytolytic thymus-derived lymphocytes specific for allogeneic
stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic
cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 1229 (1977)

LEVY, N.L., MAHALEY, S.M., DAY, E.D.:
In vitro demonstration of cell-mediated immunity to
human brain tumors.
Cancer Res. 32, 477 (1972)

LEVY, N.L.:
Specifity of lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients
with primary intracranial tumors.
J. Immunol. 121, 903 (1978)

LIM, R., KLUSKENS, L.:
Immunological specifity of astrocytoma antigens.
Cancer Res. 32, 1667 (1970)

LOOS, J.A., ROOS, D.:
Ficoll-isopaque gradients for the determination of density distribution of human blood lymphocytes and other reticuloendothelial cells.
Exp. Cell. Res. 86, 333 (1974)

DI LORENZO, N., PALMA, L., NICOLE, S.:
Lymphocytic infiltration in long-survival glioblastomas: Possible host's resistance.
Acta Neurochir. 39, 27 (1977)

MAHALEY, S.M., BROOKS, W.H., ROSZMAN, T.L. et al.:
Immunobiology of primary intracranial tumors
Part 1: Studies of the cellular and humoral general immune competence of brain-tumor patients.
J. Neurosurg. 46, 467 (1977)

MANUELIDIS, E.E.:
Long-term lines of tissue culture of intracranial tumors.
J. Neurosurg. 22, 368 (1965)

MARCUS, P.I., CIECIURA, S.J., PUCK, T.T.:
Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues.
J. exp. Med. 104, 615 (1956)

MIKULSKI, S.M., MUGGIA, F.M.:
The suppressor mechanisms and their significance in tumor immunology.
Cancer Immunol. Immunother. 4, 139 (1978)

MITCHISON, N.A.:
Passive transfer of transplantation immunity.
Proc. roy. Soc. S. B. 142, 72 (1954)

MORANTZ, R.A., WOOD, G.W., FORSTER, M., CLARK, M., GOLLAHON, K.:
Macrophages in experimental and human brain tumors.
Part 1: Studies of the macrophage content of experimental rat brain tumors of varying immunogenicity.
Part 2: Studies of the macrophage content of human brain tumors.
J. Neurosurg. 50, 298 (1979)

NACHTIGAL, D., ZAN-BAR, I., FELDMAN, M.:
The role of specific suppressor T cells in immune tolerance.
Transpl. Rev. 26, 87 (1975)

NEUWELT, E.A., CLARK, W.K.:
Clinical Aspects of Neuroimmunology.
Baltimore, Williams and Williams Company 1978

PRAGER, M.D., BAECHTEL, F.S.:
Methods for Modification of Cancer Cells to Enhance their Antigenicity.
Methods of cancer research, Vol. 9, Acad. Press, 339 (1973)

PRETLOW, T.G., BOONE, C.W.:
Separation of mammalian cells using programmed gradient sedimentation.
Exp. Mol. Path. 11, 139 (1969)

PRETLOW, T.G., II, WEIR, E.E., ZETTERGREN, J.G.:
Problems connected with the separation of different kinds of cells.
Int. Rev. Exp. Pathol. 14, 91 (1975)

PROCICCHIANI, G., FIORANI, M., REVOLTELLA, R.:
Ultrastructural studies of C1300 neuroblastoma cell interaction with syngeneic spleen lymphoid cells.
Cell. Immunol. 44, 39 (1979)

REVOLTELLA, R., BRAHE, C., PROCICCHIANI, G.:
Spontaneous Fusion and formation of hybrids between C1300 neuroblastoma cells and lymphoid cells in mixed cultures.
Cell. Immunol. 47, 115 (1979)

RIDLEY, A., CAVANAGH, J.B.:
Lymphocytic infiltration in gliomas:
Evidence of possible host resistance.
Brain 94, 117 (1971)

ROSZMAN, T.L., BROOKS, W.H.:
Immunobiology of primary intracranial tumors.
Part III: Demonstration of a qualitative lymphocyte abnormality in patients with primary brain tumors.
Clin. exp. Immunol. 39, 395 (1980)

RUSSEL, S.W., WITZ, I.P., HERBERMAN, R.B.:
A review of data, problems, and open questions pertaining to in situ tumor immunity.
Contemporary Topics in Immunobiology, Vol. 10,
In Situ Expression of Tumor Immunity.
Eds.: I.P. Witz Jr. and M.G. Hanna, Plenum Press, New York and London, 1980

RUSSEL, S.W., DOE, W.F., HOSKINS, R.G., COCHRANE, C.G.:
Inflammatory cells in solid murine neoplasms.
I. Tumor disaggregation and identification of constituent inflammatory cells.
Int. J. Cancer 18, 322 (1976)

RUSSEL, S.W., GILLESPIE, G.Y., HANSEN, C.B., COCHRANE, C.G.:
Inflammatory cells in solid murine neoplasms.
II. Cell types found throughout the course of Moloney sarcoma regression or progression.
Int. J. Cancer 18, 331 (1976)

RYSER, J.-E., SORDAT, B., CEROTTINI, J.-C., BRUNNER, K.T.:
Mechanisms of target cell lysis by cytolytic T-lymphocytes
I. Characterization of specific lymphocyte-target cell conjugates seperated by velocity sedimentation.
Eur. J. Immunol. 7, 110 (1977)

SANDERSON, C.J.:
Morphological studies of cell death by time-lapse microcinematographie.
Proc. R. Soc. London, Ser. B 192, 241 (1976)

SCHMIDEK, H.H., NIELSON. S.L., SCHILLER, A.L., MESSER, J.:
Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea.
J. Neurosurg. 34, 335 (1971)

SHEARER, G.M.:
Cell-mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngeneic lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 4, 527 (1974)

SHERMAN, L., MESHER, M.F., BURAKOFF, S.J.:
The induction of cytolytic T-lymphocytes with syngeneic trinitrophenyl-coupled membranes.
J. Immunol. 123, 501 (1979)

SHORTMAN, K.:
Physical procedures for the separation of animal cells.
Ann. Rev. Biophys., Bioengineer. 1, 93 (1972)

SPENCE, A.M., HELLSTRÖM, K.E., HELLSTRÖM, I., VAN BELLE, G., SULLIVAN, K., WAHLSTRÖM, T.:
Immunization against ethylnitrosourea-induced autochthonous neurogenic rat tumours.
Br. J. Cancer 40, 164 (1979)

STAAB, H.J., ANDERER, F.A.:
Structure and immunogenic behaviour of methylated tobacco mosaic virus.
Biochim. Biophys. Acta 427, 453 (1976)

STAAB, H.J., ANDÉRER, F.A.:
Immunogenicity of tumour cells modified with various chemicals.
Br. J. Cancer 35, 395 (1977)

STAAB, H.J., ANDERER, F.A.:
Chemical modification and immunogenicity of membrane fractions from mouse tumour cells.
Br. J. Cancer 38, 496 (1978)

STAVROU, D., DAHME, E.:
Beitrag zur Enzymhistochemie experimentell induzierter Hirntumoren beim Kaninchen.
Verhd. Dtsch. Ges. Path. 53, 548 (1969)

STAVROU, D.:
Morphologische und enzymhistochemische Untersuchungen an experimentellen PNS-Tumoren der Ratte.
Arch. Geschwulstforsch. 34, 297 (1969)

STAVROU, D.:
Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte.
I. Morphologische Befunde.
II. Enzymhistochemische Befunde.
Acta neuropath. (Berl.) 15, 220 (1970)

STAVROU, D.:
Zur vergleichbaren Pathologie der Tumoren des Nervensystems.
Zbl. Vet. Med. A 18, 585 (1971)

STAVROU, D., HAGLID, K.G., WEIDENBACH, W.:
The brain specific proteins S-100 and 14.3.2. in experimental brain tumors of the rat.
Z. ges. exp. Med. 156, 237 (1971)

STAVROU, D., HAGLID, K.G.:
Morphologie und immunologische Untersuchungen zur Histogenese experimenteller Hirntumoren.
J. neurol. Sci. 20, 39 (1973)

STAVROU, D., HAGLID, K.G., ZANKL, H., ZANG, K.D.:
Immunhistochemischer Nachweis des hirnspezifischen S-100-Proteins bei experimentellen Hirntumoren.
Z. Krebsforsch. 82, 75 (1974)

STAVROU, D.:
Mögliche immunologische Aspekte bei experimentellen Hirntumoren.
Zbl. Allg. Path. 120, 535 (1976)

STAVROU, D., ELLING, H., OSTERKAMP, U.:
Cytotoxische Antikörper gegen experimentelle Gliome.
Zbl. Allg. Path. 121, 568 (1977)

STAVROU, D., ANZIL, A.P., WEIDENBACH, W., RODT, H.:
Immunofluorescence study of lymphocytic infiltration in gliomas. Identification of T-lymphocytes.
J. Neurol. Sci. 33, 275 (1977)

STAVROU, D., ELLING, H., HAGLID, K.G.:
Demonstration of humoral antibodies against autologous glioma cells in experimental rabbit gliomas.
J. Neuropath. Exp. Neurol. 37, 694 (1978)

STAVROU, D., ZÄNKER, K., ANZIL, A.P.:
Morphological immunocytochemical and biological characteristics of experimental rabbit brain tumors in tissue culture.
J. Neurol. Sci. 42, 365 (1979)

STAVROU, D., OSTERKAMP, U., SCHRÖDER, B., ANZIL, A.P., ZÄNKER, K.:
Selected morphological immunocytochemical and growth characteristics of three experimental rat gliomas and their cells in vitro.
Exp. Cell Biol. 47, (1979)

STAVROU, D., HULTÉN, M., ANZIL, A.P., BILZER, Th.:
The humoral antibody response of rats immunized with chemically modified syngeneic brain cells and glioma cells.
Int. J. Cancer 26, 629 (1980)

STEELE, G.Jr., SJÖGREN, H.O.:
Cross-reacting tumor-associated antigen(s) among chemically induced rat colon carcinomas.
Cancer Res. 34, 1801 (1974)

SVENNEVIG, J.-L., CLOSS, O., HARBOE, M., SVAAR, H.:
Characterization of lymphocytes isolated from non-lymphoid human malignant tumours.
Scand. J. Immunol. 7, 487 (1978)

TAKASUGI, M., KLEIN, E.:
A microassay for cell-mediated immunity.
Transplantation 9, 219 (1970)

THOMAS, C., KERSTING, G.:
Zur Morphologie der durch Methylnitrosoharnstoff erzeugten Hirntumoren bei der Ratte.
Naturwissenschaften 51, 144 (1964)

THOMAS, C., SIERRA, J.L., KERSTING, G.:
Hirntumoren bei Ratten nach oraler Gabe von N-Nitroso-N-Methylharnstoff.
Naturwissenschaften 54, 228 (1967)

ULMER, A.J., FLAD, H.-D.:
Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leucocytes using Percoll(R) as gradient medium.
J. Immunol. Methods 30, 1 (1979)

VOSE, B.M., VANKY, F., KLEIN, E.:
Human tumour-lymphocyte interaction in vitro.
V. Comparison of the reactivity of tumour-infiltrating, blood and lymph node lymphocytes with autologous tumour cells.
Int. C. Cancer 20, 895 (1977)

VOSE, B.M., MOORE, M.:
Suppressor cell activity of lymphocytes infiltrating human lung and breast tumours.
Int. J. Cancer 24, 579 (1979)

WAHLSTRÖM, T., LINDER, E., SAKSELA, E.:
Gliaspecific antigens in cell cultures from rabbit brain, human fetal and adult brain and gliomas.
Acta Path. Microbiol. Scand. 81, 768 (1973)

WARNATZ, H.:
Tumorimmunologie.
Stuttgart: Thieme 1975

WATERS, H. (Ed.):
The Handbook of Cancer Immunology, Vol. 3, A.
Immune status in cancer treatment and prognosis.
Garland STPM Press, New York, London 1978

WECHSLER, W., KLEIHUES, P., MATSUMOTO, S., ZÜLCH, K.J.,
IVANKOVIC, S., PREUSSMANN, R., DRUCKREY, D.:
Pathology of experimental neurogenic rat tumors chemically
induced during prenatal and postnatal life.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 360 (1969)

WECHSLER, W., PFEIFFER, S.E., SWENBERG, J.A., KOESTNER, A.:
S-100 protein in experimental rat tumours of the central
and peripheral nervous system.
Naturwissenschaften 59, 370 (1972)

WIGZELL, H.:
Specific fractionation of immunocompetent cells.
Transplant. Rev. 5, 76 (1970)

WITZ, I.P., HANNA, M.G. Jr. (Eds.):
Contemporary Topics in Immunobiology, Vol. 10.
In situ expression of tumor immunity.
Plenum Press, New York, London 1980

WOOD, W.C., MORTON, D.L.:
Microcytotoxicity test: Detection in sarcoma patients of
antibody cytotoxic to human sarcoma cells.
Science 170, 1318 (1970)

WOOD, G.W.:
Immunohistologic evaluation of the lymphoreticular infiltrate of human central nervous system tumors.
J. Nat. Canc. Inst. 62, 485 (1979)

WOOSLEY, R.E., MAHALEY, M.S. Jr., MAHALEY, J.L., MILLER, G., M., BROOKS, W.H.:
Immunobiology of primary intracranial tumors.
Part 3: Microcytotoxicity assays of specific immune responses of brain tumor patients.
J. Neurosurg. 47, 871 (1977)

WYSOCKI, L.J., SATO, V.L.:
"Panning" for lymphocytes: a method for cell selection.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 2844 (1978)

ZETTERGREN, J.G., LUBEROFF, D.E., PRETLOW, T.G.:
Separation of lymphocytes from disaggregated mouse malignant neoplasms by sedimentation in gradients of Ficoll in tissue culture medium.
J. Immunol. 111, 836 (1973)

Ich möchte allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit geholfen haben, herzlich danken, insbesondere Herrn Prof. Dr. D. Stavrou.

Herr Prof. Dr. E. Dahme ermöglichte mir, die Einrichtungen seines Lehrstuhls jederzeit für meine Arbeit zu beanspruchen und förderte in großzügiger Weise die Fertigstellung der Arbeit.

Frau Dr. B. Schröder und Herr Dr. A. Pospischil, beide am Institut für Tierpathologie, sowie Herr Dr. A. P. Anzil, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, unterstützten mich bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Sehr wesentlich waren die technischen Hilfen von Frau D. Wallmann, Frau A. Lechner und Herrn S. Lutz.

LEBENSLAUF

Ich wurde am 24. Mai 1951 als Sohn des Diplom-Volkswirts Wolfgang Bilzer und seiner Ehefrau Hella, geb. Pohl, in Frankfurt am Main geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich Volksschulen in Frankfurt, Dietzenbach im Kreis Offenbach und Nürnberg. 1961 trat ich in das Willstätter-Gymnasium in Nürnberg ein und legte dort am 19. Juni 1971 die Reifeprüfung ab.

Von 1971 - 1973 studierte ich an der Universität München ev. Theologie. Im Wintersemester 1972 begann ich in München mit dem Studium der Tiermedizin, das ich am 9. November 1978 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit Mitte 1978 arbeite ich am Institut für Tierpathologie bei Herrn Prof. Dr. D. Stavrou an der vorliegenden Arbeit. Von August bis November 1980 war ich am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie als wissenschaftliche Hilfskraft tätig.